

UNTERSUCHUNGEN ZUR
AKROSOMREAKTION UND SPERMATOZOENMOTILITÄT
BEI VERSCHIEDENEN
ANDROLOGISCHEN KRANKHEITSBILDERN

CHRISTOPH VOLCKER

Diss
München
1906



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554808_0050

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der
Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. O. Braun-Falco

Untersuchungen zur Akrosomreaktion und Spermatozoenmotilität
bei verschiedenen andrologischen Krankheitsbildern

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Christoph Völcker
aus
München

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. W.-B. Schill

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. O. Braun-Falco

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung:

Für meinen Freund und Studienkollegen

Gerhard Pawolka,

der uns am 18. Januar 1984 für immer verlassen hat.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Seite

1.	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	Die Befruchtung - Entstehung neuen Lebens	1
1.2	Die klinische Andrologie heute	2
1.3	Zielsetzungen dieser Arbeit	3
2.	<u>GRUNDLAGEN (LITERATURÜBERSICHT)</u>	5
2.1	Morphologie und Biochemie menschlicher Spermatozoen ..	5
2.1.1	Morphologie	5
2.1.2	Biochemie	7
2.2	Motilität menschlicher Spermatozoen	8
2.2.1	Bedeutung der Motilität	8
2.2.2	Untersuchungsmethoden und Beurteilungskriterien	9
2.2.3	Der Begriff "Whiplash"-Bewegung	11
2.2.4	Spermatozoenmotilität im männlichen Genitaltrakt	11
2.2.4.1	Motilität im Nebenhoden	11
2.2.4.2	Motilität zum Zeitpunkt der Ejakulation	13
2.2.4.3	Beeinflussung der Motilität durch das Seminalplasma .	13
2.2.5	Spermatozoenmotilität im weiblichen Genitaltrakt	15
2.2.5.1	Motilität in der Vagina	15
2.2.5.2	Motilität im Zervixmukus	15
2.2.5.3	Motilität im Uterus und in den Eileitern	17
2.2.6	Energieversorgung der Spermatozoen	18
2.3.	Vorbereitung der Spermatozoen auf die Befruchtung der Eizelle	20
2.3.1	Kapazitation	21
2.3.1.1	Begriffserklärung	21
2.3.1.2	Entdeckung der Kapazitation	21
2.3.1.3	Kapazitationszeit	22
2.3.1.4	Biochemische Vorgänge während der Kapazitation	24
2.3.1.5	Biochemische Voraussetzungen für die Kapazitation in vitro	24

2.3.1.6	Bedeutung der Kapazitation	27
2.3.2	Akrosomreaktion	29
2.3.2.1	Begriffserklärung	29
2.3.2.2	Entdeckung der Akrosomreaktion	29
2.3.2.3	Morphologische und biochemische Vorgänge während der Akrosomreaktion	30
2.3.2.4	Biochemische Voraussetzungen für die Akrosomreaktion in vitro	33
2.3.2.5	Ablauf der Akrosomreaktion in vivo	33
2.3.2.6	Bedeutung der Akrosomreaktion	36
2.3.3	Hyperaktivierung ("Whiplash"-Bewegung)	36
2.3.3.1	Begriffserklärung	36
2.3.3.2	Entdeckung der "Whiplash"-Bewegung	37
2.3.3.3	Biochemische Voraussetzungen für die "Whiplash"- Bewegung in vitro	38
2.3.3.4	Ablauf der "Whiplash"-Bewegung in vivo	38
2.3.3.5	Bedeutung der "Whiplash"-Bewegung	40
2.4	Klinische Anwendung	41
2.4.1	Möglichkeiten einer klinischen Beurteilung der Befruchtungsfähigkeit menschlicher Spermatozoen	41
2.4.2	Befruchtungsfähigkeit der Spermatozoen bei ver- schiedenen andrologischen Krankheitsbildern	44
2.4.2.1	Oligozoospermie	44
2.4.2.2	Idiopathische Infertilität	45
2.4.2.3	Polyzoospermie	46
3.	<u>EIGENE EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN</u>	47
3.1	Patientengut	47
3.2	Spermaanlyse	48
3.3	Verwendete Lösungen	48
3.4	Induktion der Akrosomenreaktion und der Hyperaktivierung	49

3.5	Beurteilung der Akrosomreaktion mittels der Triple-stain-Technik	50
3.5.1	Methode	50
3.5.2	Auswertung	51
3.5.3	Anmerkungen zur Methode	53
3.6	Beurteilung der Motilität mittels der Dunkelfeldmethode	54
3.6.1	Methode	54
3.6.2	Auswertung	57
3.7	Statistische Auswertung	58
4.	<u>VERSUCHSERGEBNISSE</u>	59
4.1	Ergebnisse der Routinediagnostik	59
4.2	Akrosomreaktion	59
4.2.1	Akrosomreaktion bei Männern mit erwiesener Fertilität	59
4.2.2	Akrosomreaktion bei Patienten mit normalen Spermiogramm	64
4.2.3	Akrosomreaktion bei Patienten mit abnormem Spermiogramm	66
4.2.4	Akrosomreaktion bei Polyzoospermie	69
4.2.5	Ein Vergleich der Akrosomreaktion bei fertilen Männern und Männern mit Normozoospermie und Polyzoospermie ..	74
4.3	Motilitätseigenschaften	75
4.3.1	Motilität bei Normozoospermie und bei fertilen Männern	75
4.3.2	Motilität bei Polyzoospermie	78
4.3.3	Motilität bei Patienten mit abnormem Spermiogramm ...	81

5.	<u>DISKUSSION</u>	86
5.1	Allgemeines	86
5.2	Methodik	87
5.3	Normale Akrosomreaktion	90
5.4	Pathologische Akrosomreaktion	91
5.5	Akrosomreaktion bei Polyzoospermie	92
5.6	Hyperaktivierung bei Polyzoospermie	93
5.7	Weitere Befunde bei Polyzoospermie	94
6.	<u>SCHLUSSFOLGERUNG</u>	97
7.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	99
8.	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	101
9.	<u>DANKSAGUNG</u>	124
10.	<u>LEBENS LAUF</u>	125

1. EINLEITUNG

1.1 Die Befruchtung - Entstehung neuen Lebens

Es ist eine bemerkenswerte Tatsache, daß die komplexen Vorgänge vor und während der Befruchtung einer Eizelle durch ein Spermatozoon, aus der dann ein neues Leben hervorgeht, zwar in wesentlichen Schritten bekannt sind, wichtige Einzelheiten und Zusammenhänge dabei jedoch auch heute noch weitgehend unerforscht sind. Dies ist um so erstaunlicher, als es sich hierbei um eine zentrale Frage der Biologie und Medizin, aber auch der Philosophie und Religion handelt, nämlich um die Frage der Entstehung des Lebens überhaupt. Obwohl wir in den letzten Jahrzehnten durch zahlreiche Forschungsarbeiten bedeutende neue Erkenntnisse rund um die Befruchtung gewonnen haben, beschränkt sich das Wissen über diese Vorgänge dennoch auf bestimmte mit unseren Beobachtungs- und Meßmethoden erfaßbare morphologische und biochemische Phänomene, deren vielfältiges, ständig wechselndes Zusammenspiel unter in vivo-Bedingungen noch wenig verstanden ist.

Die faszinierende Beobachtung, daß aus der Vereinigung zweier Zellen ein neues Lebewesen mit eigenem Bewußtsein und eigener Identität entsteht, ist mit unserem naturwissenschaftlichen Wissen nicht ausreichend erklärbar. Die Frage nach der Natur und dem Ursprung des Lebens muß offen bleiben. Doch gerade die unverstandenen Vorgänge während der Befruchtung und deren Hintergründe üben wie alles Unbekannte eine große Faszination aus.

1.2 Die klinische Andrologie heute

Während die Erforschung der Grundlagen der Reproduktionsbiologie in den vergangenen drei Jahrzehnten sehr großes Interesse fand, führt die klinische Andrologie eher ein Schattendasein.

In der Tat sind die Kenntnisse im Hinblick auf männliche Fertilitätsstörungen erstaunlich gering, wogegen die diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten bei weiblichen Fruchtbarkeitsstörungen weit vielfältiger sind. Es ist bezeichnend, daß bei einem hohen Prozentsatz der Männer die Ursache der Infertilität mit den heutigen diagnostischen Mitteln nicht festzustellen ist, da deren Aussagekraft bezüglich der Befruchtungsfähigkeit der untersuchten Spermatozoen sehr gering ist (vgl. Aitken 1983). Dies hat zur Folge, daß die Behandlung der männlichen Sterilität nach wie vor überwiegend empirisch ist und häufig erfolglos bleibt.

Aus diesem Grund sollte es ein vorrangiges Ziel klinisch-andrologischer Forschung sein, die bisherigen, zu wenig aussagekräftigen diagnostischen Methoden (z.B. Beurteilung von Spermatozoendichte, -morphologie und -motilität und von Seminalplasma-Eigenschaften) durch neue Techniken zu ergänzen, die eine spezifische Aussage über die Befruchtungskapazität der Spermatozoen zulassen.

Eine Verbesserung der diagnostischen Möglichkeiten hätte weitreichende Konsequenzen:

1. Es könnten zuverlässigere Aussagen über die Prognose einer Fertilitätsstörung gemacht werden.

2. Die verschiedenen therapeutischen Möglichkeiten könnten gezielter eingesetzt werden (z.B. künstliche Besamung mit den Spermatozoen des Ehemannes bei eingeschränkter Wanderungsfähigkeit im Eileiter und intakter Befruchtungsfähigkeit, künstliche Besamung durch einen Spender bei völliger Befruchtungsunfähigkeit der Spermatozoen des Partners; vgl. Aitken et al. 1983).
3. Es wäre eine effektivere Auswahl der Patienten für eine In-vitro-Fertilisation möglich (Aitken et al. 1983).

In den vergangenen Jahren wurden bereits einige Schritte in diese Richtung getan. Auch die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zur Erweiterung der diagnostischen Möglichkeiten innerhalb der Andrologie leisten.

1.3 Zielsetzungen dieser Arbeit

Im Wesentlichen verfolgt diese Arbeit folgende Ziele:

1. Zusammenfassung wichtiger Forschungsergebnisse über die Veränderungen, die die Spermatozoen vor und während der Befruchtung eingehen, ausführliche Erläuterung der Begriffe Kapazitation, Akrosomreaktion und Hyperaktivations.
2. Einführung der Triple-stain-Technik in die andrologische Diagnostik zur gezielten Untersuchung einzelner Patientengruppen. Die Triple-stain-Technik (= Dreifach-Färbe-Technik) dient der Beurteilung der Akrosomreaktion in vitro. Sie wurde 1981 von Talbot und Chacon beschrieben.

3. Untersuchung der Akrosomreaktion bei Patienten mit Polyzoospermie (Spermatozoendichte > 250 Mill./ml.).

Untersuchung einer Vergleichsgruppe von Männern mit erwiesener Fertilität sowie von Patienten mit normalem Spermogramm. Exemplarische Untersuchungen bei unterschiedlichen spermatologischen Auffälligkeiten (Oligozoospermie, Teratozoospermie, Asthenozoospermie).

4. Untersuchung des zeitlichen Auftretens des hyperaktivierten Bewegungsmusters ("Whiplash"-Bewegung) bei den genannten Patientengruppen. Sie wurde mit Hilfe einer mikrophotografischen Dunkelfeldmethode durchgeführt (Overstreet et al. 1979).

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt bei der Untersuchung der Polyzoospermie. Bei dieser Störung werden trotz des Vorhandenseins überdurchschnittlich vieler Spermatozoen im Ejakulat Konzeptionen selten beobachtet. Die Ursache dieser Infertilität ist bis heute nicht geklärt. Erste Hinweise lassen eine akrosomale Störung bei diesen Spermatozoen vermuten. Da es sich aber zunächst um Einzelbeobachtungen gehandelt hatte, war es das Ziel dieser Arbeit sowie einiger parallel laufenden Untersuchungen an einer größeren Gruppe von Patienten mit Polyzoospermie das Akrosom der Spermatozoen mit Hilfe biochemischer, immunzytochemischer und zytochemischer Methoden zu untersuchen und mit einem Kontrollkollektiv zu vergleichen (Schill und Feifel 1984; Schill et al. 1984).

Die Ergebnisse dieser Studie lassen den Schluß zu, daß die Ursache der Infertilität bei Polyzoospermie vermutlich in einer schweren funktionellen Störung des Akrosoms dieser Spermatozoen zu suchen ist.

2. GRUNDLAGEN (LITERATURÜBERSICHT)

2.1 Morphologie und Biochemie menschlicher Spermatozoen

Das Spermatozoon stellt eine hochdifferenzierte Zelle mit einem sehr komplexen Aufbau dar. Die Ausdifferenzierung erfolgt während einer über 2 Monate dauernden Entwicklungszeit in den Tubuli seminiferi des Hodens sowie einer anschließenden Ausreifungszeit im Nebenhoden.

2.1.1 Morphologie

Das Spermatozoon benötigt diese komplexe Struktur, um seine spezifischen Funktionen aus eigener Kraft erfüllen zu können: Wanderung durch den weiblichen Genitaltrakt, Eindringen in die Hüllen der Eizelle und Befruchtung der Eizelle.

Das reife Spermatozoon ist aufgebaut aus (Abb. 1):

1. Dem Kopf, der ca. 3-5 μm lang, 2,5-3,5 μm breit und 1,5 μm tief ist. Die beiden wichtigsten Bestandteile sind der Zellkern mit dem haploiden Chromosomensatz und das Akrosom, das kappenartig den apikalen Teil des Kopfes bedeckt und die Penetrationsenzyme enthält.
2. Dem kurzen Hals, der die Zentriolen enthält.
3. Dem Mittelstück, in dessen zahlreichen Mitochondrien die Energie für die Schwanzbewegung bereitgestellt wird. Der Achsenfaden besteht aus zahlreichen Fibrillen, die bis in den Schwanz hineinreichen und für dessen Motilität verantwortlich sind.

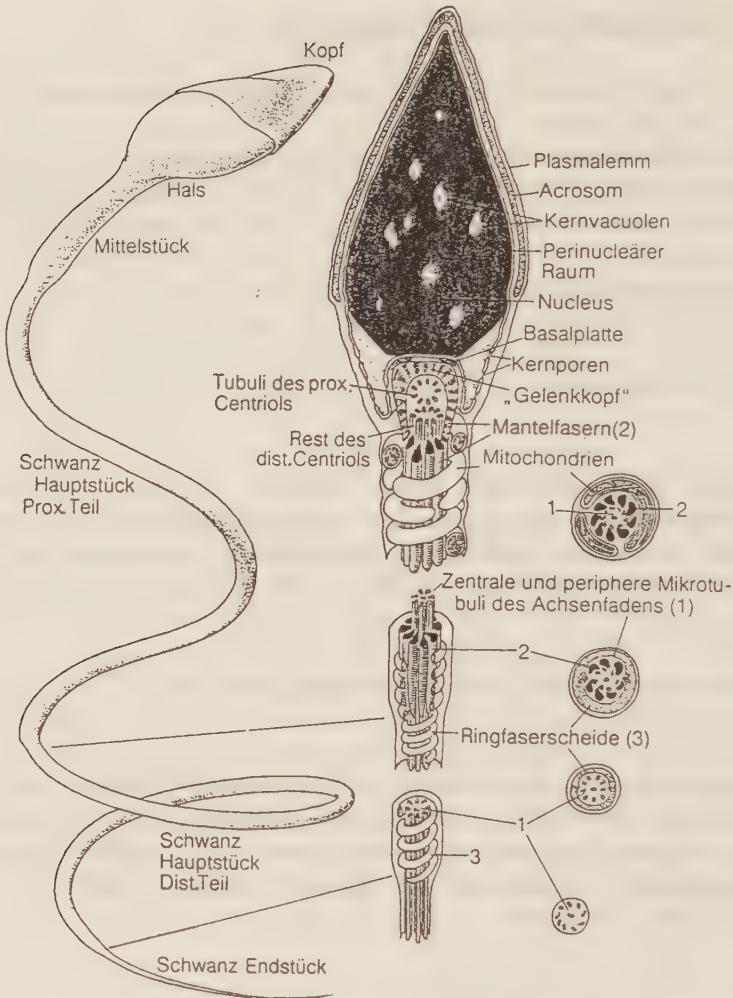


Abb. 1: Schema des Feinbaues der menschlichen Samenzelle (nach Krstić 1976)

4. Dem Schwanz, der den größten Anteil an der etwa 50 µm betragenden Gesamtlänge des Spermatozoons stellt. Die Fibrillen weisen hier ebenso wie im Mittelstück die charakteristische "9 + 2" -Struktur auf. Im Mittelstück und im proximalen Schwanzabschnitt sind diesen Fäden weitere neun, wesentlich dickere homogene Fibrillen aufgelagert. Am distalen Schwanzende fehlt die "9 + 2" -Struktur.

Das gesamte Spermatozoon ist von einer Plasmamembran (Plasmalemma) überzogen. Am Akrosom befindet sich unmittelbar unter der Plasmamembran die äußere akrosomale Membran. Auf der inneren, dem Zellkern benachbarten Seite des Akrosom befindet sich die innere akrosomale Membran. Im Bereich des Äquatorialssegmentes gehen äußere und innere akrosomale Membran ineinander über und schließen somit das Akrosom nach kaudal ab. Beide Membranen zusammen bilden somit eine Tasche, die den akrosomalen Inhalt umschließt.

2.1.2 Biochemie

Die biochemisch bedeutsamsten Stoffe, die im Akrosom nachgewiesen werden können, sind die drei Penetrationsenzyme (Hyaluronidase, Corona-penetrating enzyme, Akrosin). Außerdem wurden Inhibitoren, z.B. der Akrosin-Inhibitor, im Akrosom entdeckt. Die Penetrationsenzyme dienen der lokalen Auflösung und Perforation der Eihüllen, d.h. des Cumulus oophorus (Follikelzellen), der Corona radiata und der Zona pellucida.

Die Akrosinaktivität einer Spermatozoenpopulation korreliert gut mit der Fertilität bzw. Infertilität des jeweiligen Individuums (Mohsenian et al. 1981). Auch bei den von uns untersuchten, meist infertilen Polyzoospermie-Patienten wurden die Akrosinaktivitäten gemessen, wobei ebenfalls eine erniedrigte Akrosinaktivität festgestellt wurde (Schill und Feifel 1984).

Außerdem enthalten die Spermatozoen Enzyme für die Glykolyse, den Citratzyklus, die Fettsäureoxidation, die Atmungskette und den Pentosephosphatzyklus (Moghissi, 1972). Diese Enzyme befinden sich in den Mitochondrien des Mittelstückes und verleihen den Spermatozoen die Fähigkeit, eine Reihe exogener und endogener Substrate zu metabolisieren. Dabei steht an erster Stelle die Verstoffwechslung von Kohlenhydraten, die von der Umgebung aufgenommen werden müssen, da Spermatozoen nur geringe endogene Glykogenvorräte besitzen. Während das menschliche Sperma an Kohlenhydraten vor allem Fruktose enthält, werden den Spermatozoen im Zervixmucus und in den uterinen Sekreten an erster Stelle Glukose in reichlichem Maße angeboten.

Diese Stoffwechselvorgänge sind zur Erhaltung eines ausreichenden ATP-Niveaus erforderlich, um eine kontinuierliche Aufrechterhaltung der Spermatozoen-Motilität zu gewährleisten (Schirren et al. 1977).

2.2 Motilität menschlicher Spermatozoen

2.2.1 Bedeutung der Motilität

Eine der wichtigsten spezifischen Funktionen der Spermatozoen ist die Fähigkeit zur eigenständigen Vorwärtsbewegung. Mit ihr werden folgende drei Ziele verfolgt:

1. Zurücklegung großer Wegstrecken (durch den Zervixmucus, den Uterus und die Eileiter bis in die Ampulle) in relativ kurzer Zeit. Beachtenswert ist die Länge der gesamten Strecke im Verhältnis zur Länge eines einzelnen Spermatozoons!

2. Möglichst effektive Suche nach einer sich eventuell in der Ampulle befindenden Eizelle. Zu diesem Zweck bleibt das Spermatozoon in der Tube für mehrere Stunden in Bewegung und stellt sich auf einen hypermotilen Bewegungstypus um (Suarez et al. 1983).

3. Beim Eindringen des Spermatozoons in die Hülle der Eizelle spielt die Antriebskraft des schlagenden Schwanzes eine entscheidende Rolle.

Motilitätsstörungen können sehr unterschiedliche Ursachen haben und bedingen eine verminderte bis fehlende Fruchtbarkeit des Individuums.

2.2.2 Untersuchungsmethoden und Beurteilungskriterien

In der Vergangenheit wurde eine ganze Reihe von Untersuchungsmethoden entwickelt, die mit sehr unterschiedlicher Objektivität und Genauigkeit die einzelnen Parameter der Spermatozoen-Motilität erfassen. Es handelt sich dabei um folgende Techniken (modifiziert nach Mitchel et al. 1976):

1. Phasenkontrastmikroskopie und Verwendung einer Stoppuhr
2. Spektrophotometrische Messungsverfahren
3. "Time Exposure" Photographie (z.B. im Dunkelfeld: Overstreet et al. 1979)
4. Ultraviolettlicht - Absorption
5. "Sedimentation Orientation"
6. Kinematographie mit dem Stroboskop.
7. Direktbeobachtung mit Hilfe des Phasenkontrastmikroskopes
8. "Multiple Exposure" - Photographie (Makler 1978 a, b)

9. Dreifarbige Photographie (Lysikiewicz und Enhorning 1983)
10. Laser-Doppler-Spektroskopie (Steiner et al. 1982)

Die einzelnen Techniken weisen erhebliche Unterschiede bezüglich ihrer Genauigkeit und der Differenziertheit ihrer Auswertungskriterien auf. Overstreet und Mitarbeiter (1979) schlagen z. B. für ihre Methode folgende sehr detaillierten Beurteilungskriterien der Spermatozoenmotilität vor:

1. Unbewegliche Spermatozoen
 2. Bewegliche Spermatozoen
 3. Durchschnittsgeschwindigkeit der motilen Spermatozoen in $\mu\text{m}/\text{sec}$.
 4. Progessiv bewegliche Spermatozoen ($> 25 \mu\text{m}/\text{sec}$) in % der beweglichen Spermatozoen
 5. Durchschnittsgeschwindigkeit der progressiv beweglichen Spermatozoen
- } in % der Gesamtspermienzahl

Außerdem werden die verschiedenen Bewegungsmuster beurteilt und wie folgt charakterisiert:

1. Ortsbewegliche Spermatozoen (nur der Schwanz bewegt sich)
2. Geradlinig schwimmende Spermatozoen
3. Bogenförmig schwimmende Spermatozoen
4. Rollende (drehende) Spermatozoen (in der Bildebene sieht man eine symmetrische, gleichmäßig wellenförmige Abbildung der Drehbewegung).
5. Gierende (schlingernde) Spermatozoen (in der Bildebene sieht man eine asymmetrische, unregelmäßig wellenförmige Abbildung der Schlingerbewegung).

2.2.3 Der Begriff "Whiplash"-Bewegung

Ein Bewegungstypus, der hier nicht ausdrücklich klassifiziert wurde, war in den letzten Jahren Gegenstand zahlreicher Untersuchungen (z.B. Katz und Yanagimachi 1980 und 1981; Cummins 1982; Suarez et al. 1983; Cooper 1984).

Yanagimachi (1969 a, b, 1970, 1981) beschrieb als erster bei kapazitierten Hamsterspermatozoen in vitro und in vivo Veränderungen der Beweglichkeit gegenüber dem nicht kapazitierten Zustand, die er "Aktivierung" nannte. Heute wird dieser Bewegungstyp meist hyperaktivierte Motilität oder "Whiplash"-Bewegung genannt. Er ist charakterisiert durch eine vermehrte Amplitude der Schwanzbewegungen mit verstärkter Flexion des Spermatozoenhalses und ist zusätzlich gekennzeichnet durch eine Asymmetrie der Schwanzschläge (Cummins 1982). Somit wäre die "Whiplash"-Bewegung wohl am ehesten unter Punkt 5) der obengenannten Bewegungsmuster einzuordnen. Die weit ausholenden Schwanzbewegungen erinnerten die Untersucher an peitschenartige Schläge ("whiplash-like flagellar bending", Katz und Yanagimachi 1980) und gaben der "Whiplash"-Bewegung ihren Namen.

2.2.4 Spermatozoenmotilität im männlichen Genitaltrakt

2.2.4.1 Motilität im Nebenhoden

Während ihrer Entwicklungszeit im Hoden und Nebenhoden zeigen die heranreifenden Spermatozoen noch keine eigene Motilität. Der Transport in den Nebenhoden erfolgt passiv durch Flüssigkeitsstrom, Mikrokontraktionen und Zilienaktivität. Im Epididymis werden die Spermatozoen einer Reihe von morphologischen und biochemischen Veränderungen unterworfen, wodurch sie schließlich bewegungsfähig und befruchtungsfähig werden (Hinrichsen und Blaquier

1980). Die ausgereiften Spermatozoen verweilen dann im Nebenhodenschwanz einige Zeit (ca. 10-14 Tage) in einem Ruhezustand, der durch fehlende Motilität und eine sehr niedrige Metabolismusrate gekennzeichnet ist, die den Spermatozoen diesen relativ langen Aufenthalt erlaubt (Bedford 1975; Fray et al. 1972; Mooney et al. 1972; Morita und Chang 1970; Murdock und White 1968; Saito et al. 1967. a + b; White et al. 1959; White und Wales 1961).

Untersucht man Spermatozoen aus den verschiedenen Teilen des Nebenhodens, so lassen sich unterschiedliche Motilitätsmuster feststellen (Fuchs und Belonoschkin 1942). Spermatozoen aus dem Nebenhodenkopf führen kräftige, wild peitschende Schwanzbewegungen ohne größeren Raumgewinn durch. Die Fähigkeit zur schnell raumgewinnenden Propulsivbewegung erlangen die Spermatozoen erst in der Mitte des Nebenhodenkörpers. Ascott und Mitarbeiter (1983) haben bei Nebenhodenspermatozoen des Bullen mittels Zeitraster-Kinemikrografie den Übergang von der erstgenannten in letztere Bewegungsform analysiert. Dabei ist bemerkenswert, daß die Spermatozoen aus dem Nebenhodenkopf in einer Weise schwimmen, die der hyperaktivierten "Whiplash"-Bewegung ausgesprochen ähnlich ist. Da diese im Nebenhodenkörper anschließend in die Propulsivbewegung übergeht, also genau umgekehrt wie bei der Kapazitation der Spermatozoen im Eileiter (siehe unten), sprechen Suarez und Mitarbeiter (1983) von einem zur "Hyperaktivierung" spiegelbildlichen Prozess im Nebenhoden.

Bemerkenswert ist die Erkenntnis, daß nur Spermatozoen aus dem Nebenhodenschwanz, nicht aus dem Kopf oder Körper des Nebenhodens, nach der erforderlichen Kapazitationszeit befruchtungsfähig sind.

2.2.4.2 Motilität zum Zeitpunkt der Ejakulation

Das Einsetzen (Initiation) der Spermatozoen-Motilität erfolgt im Moment der Ejakulation. Sofort beginnen die Spermatozoen mit ihrer charakteristischen Propulsivbewegung, d.h. sie zeigen eine starke Vorwärtsbewegung bei relativ geringer Schwanzamplitude. Die auslösenden Faktoren für das plötzliche Auftreten der Motilität nach der Ejakulation sind bisher so gut wie nicht erforscht. Es gibt jedoch einige Theorien, die den Mechanismus der Initiation der Motilität zu erklären versuchen (Mitchell et al. 1976; Rosado et al. 1982): Eine wichtige Rolle könnte beispielsweise die Aufhebung der räumlichen Beengung der Spermatozoen spielen. Von großer Bedeutung dürfte die plötzliche Reduktion der Osmolarität, die Zugabe von verstoffwechselbaren Substraten sowie die Veränderung anderer Milieuparameter nach Zusatz der Sekrete aus den akzessorischen Geschlechtsdrüsen sein. Weiterhin wird die Umstellung des anaeroben in den aeroben Stoffwechselzustand während der Ejakulation als auslösender Faktor diskutiert.

2.2.4.3 Beeinflussung der Motilität durch das Seminalplasma

Für das Einsetzen der Motilität und für die erste Phase der Spermatozoenmigration dürfte somit der Beschaffenheit des Seminalplasmas eine entscheidende Rolle zufallen. Das Seminalplasma, das ca. 95 % des gesamten Ejakulatvolumens ausmacht, bietet den Spermatozoen zu diesem Zweck reichliche Energievorräte an und schützt sie gegen das saure Milieu des Vaginalsekretes.

Das Seminalplasma setzt sich aus den Sekreten der Prostata (ca. 45 % des Ejakulatvolumens), der Bläschendrüsen (ca. 40 %), der Nebenhoden, der Ductus deferentes und der Cowperschen Drüsen zusammen. Die Motilität und die Vitalität der Spermatozoen sind

abhängig von einem optimalen Verhältnis zwischen den Sekreten der Prostata und der Bläschendrüsen. Das Sekret der Bläschendrüsen enthält einen oder mehrere Faktoren, die die Motilität und Vitalität der Spermatozoen beeinträchtigen. Andererseits stimuliert das Sekret der Prostata die Spermatozoen-Motilität. Im Kontakt mit dem prostaticen Sekret können sich die Spermatozoen gegen die negativen Einflüsse des Bläschendrüsensekretes schützen (Elisasson et al. 1974). Die biochemische Zusammensetzung des Seminalplasmas ist bei jedem Individuum ziemlich konstant und unabhängig von der Frequenz der Ejakulationen (Eliasson 1965).

Die biochemische Natur des motilitätsstimulierenden Faktors des Prostatasekretes ist bis jetzt nicht aufgeklärt. Da die Mehrzahl der Spermatozoen mit der ersten Spermafraktion ejakuliert wird und diese zum größeren Teil aus Prostatasekret besteht, weist der an Spermatozoen reiche Teil des Ejakulates eine bessere Motilität bzw. eine höhere Überlebensfähigkeit der Samenzellen auf als die Spermatozoen, die mit der letzten Spermafraktion ejakuliert werden. Im Einklang mit diesen Befunden steht die Beobachtung, daß eine Entzündung der Prostata über eine Veränderung der Ejakulatbeschaffenheit zu einer Motilitätseinschränkung führen kann, während Patienten mit einer Bläschendrüsenabnormalität (z.B. erniedrigten Fruktosespiegel) sogar eine Verbesserung des Motilitätsmusters aufweisen können.

Als Grundlage der Energiegewinnung dient den Spermatozoen im Seminalplasma vor allem die Fruktose, die in hoher Konzentration im Bläschendrüsensekret enthalten ist.

2.2.5 Spermatozoenmotilität im weiblichen Genitaltrakt

2.2.5.1 Motilität in der Vagina

Nach der Ejakulation in die Vagina kommen die Spermatozoen mit den weiblichen Genitalsekreten in Kontakt. Die Spermatozoen-Motilität unmittelbar nach Deposition in die Vagina bei normalen Geschlechtsverkehr ist; bisher noch kaum erforscht worden. Bei einer Untersuchung des vaginalen Spermapools nahe der hinteren Fornix unmittelbar nach der Ejakulation beobachtet man lebhaft motile Spermatozoen. Doch das vaginale Milieu übt anscheinend einen hemmenden bzw. sogar schädigenden Einfluß auf die Spermatozoen-Vitalität und -Motilität aus. Dabei ist ein entscheidender Faktor das saure Milieu der Vagina (pH 3,5-5,0). Doch möglicherweise beeinflussen noch andere Faktoren des vaginalen Milieus die Spermatozoenfunktion und somit die Progressiv-Motilität.

Bereits 90 Minuten nach der Ejakulation ist ein großer Prozentsatz der Spermatozoen in der Vagina schwanzlos (MacLeod et al. 1959). Der Schwanzverlust der Samenzellen im vaginalen Milieu ist bei einigen Individuen ausgeprägt und kann bei anderen fehlen. Durch Abtrennung des Schwanzes werden die Spermatozoen unbeweglich. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die spermienschädigende Wirkung des vaginalen Milieus.

2.2.5.2 Motilität im Zervixmukus

Im Gegensatz zum Vaginalmilieu ist das Milieu der Cervix uteri ausgesprochen spermatozoenfreundlich. Hier finden die Spermatozoen ebenso wie im Uterus und Eileiter weit bessere Bedingungen, um über längere Zeit vital und motil bleiben zu können. Das Muster der Spermatozoen-Migration im Zervixmukus ist je nach dem Stadium des Menstruationszyklus unterschiedlich: Vor und nach

der Menstruation können die Spermatozoen nicht in den Zervixmukus eindringen. Im Gegensatz dazu bringen Spermatozoen in den ovulatorischen Zervixmukus rasch ein. Dabei wird in vitro das Phalanxphänomen beobachtet, das durch sog. Pionierspermatozoen verursacht wird (Blandau 1969). Die Spermatozoen-Migration erscheint am schnellsten im dünnen, wässrigen Zervixmukus, der eine gute Spinnbarkeit aufweist. Die Samenzellen benötigen ca. 15 Minuten, um 3 cm periovulatorischen Zervixmukus zu durchdringen (Harvey 1954).

Das Eindringen der Spermatozoen aus der ungünstigen vaginalen Umgebung in den spermienfreundlichen Zervixmukus wird in der periovulatorischen Menstruationsphase durch folgende Mechanismen gefördert (Igarashi 1978): Da in diesem Zeitraum der Zervixmukus eine erhebliche Spinnbarkeit aufweist, hängt der Mukus vom Os externum wie eine Leiter in die Vagina herab. Spermatozoen, die während oder nach der Ejakulation Kontakt mit dieser "Leiter" bekommen, bleiben durch die adhäsiven Eigenschaften des Mukus dort haften, dringen in ihn ein und wandern diese "Leiter" entlang, bis sie das Cavum uteri erreichen. Außerdem werden zum periovulatorischen Termin Os externum und Zervikalkanal erweitert und gelockert, wobei das Volumen des Zervixmukus deutlich zunimmt. Diese Veränderungen erleichtern ebenfalls die Spermatozoen-Migration durch den Gebärmutterhals.

Der Zervixmukus hat zusätzlich folgende wichtige Funktionen wahrzunehmen (Igarashi 1978):

1. Energieversorgung der Spermatozoen mit Glukose, Galaktose usw.;
2. Biologische Filterfunktion, um überwiegend normal konfigurierte Spermatozoen penetrieren zu lassen;
3. Spermatozoenspeicherung;
4. Möglicher Ort, an dem die Kapazitation der Spermatozoen stattfindet.

Die Konsistenz des Zervixmukus bestimmt das Motilitätsmuster der Spermatozoen. Im dünnflüssigen periovulatorischen Mukus zeigen die Spermatozoen eine kräftige Progressiv-Motilität mit einer deutlichen Reduktion der Schwanzamplitude und der Kopfrotation. Im Gegensatz dazu nimmt die Geschwindigkeit der Spermatozoen im hochviskösen Mukus ab bzw. sie wird vollständig gehemmt. Dabei zeigen die Schwänze Kreisbewegungen (Harvey 1954).

Die Zahl der Spermatozoen im Mukus nimmt mit zunehmender Distanz von der Ejakulat-Mukus-Grenze ab. Anscheinend verfügen also nicht alle Spermatozoen über den gleichen Energievorrat für ihre Motilität. Auch unter optimalen Bedingungen hinsichtlich Spermatozoen-Motilität und Zervixmukus-Qualität gelingt es weniger als 1: 100, oft nur 1:1.000 bis 1:2.000 motilen Spermatozoen die Barriere des Zervixmukus zu durchdringen, um das Cavum uteri zu erreichen (Harvey 1954).

2.2.5.3 Motilität im Uterus und in den Eileitern

Nach der Zervixpassage gelangen die Spermatozoen in das intra-uterine Milieu. Bisher ist über die Einflüsse des Uterussekretes auf die Spermatozoen-Motilität wenig bekannt. Jedoch können die verschiedenen Sekrete des weiblichen Genialtraktes das Motilitätsmuster verändern. So läßt sich zum Beispiel die Geschwindigkeit der Spermatozoen in Anwesenheit der Sekrete der Tuben, der Hydrosalpinx und des Peritoneums steigern. Außerdem wird die Motilität und Überlebensrate gewaschener Spermatozoen durch menschliche Follikelflüssigkeit signifikant erhöht (Hicks et al. 1972).

Ein weiteres Hindernis für die Wanderung der Spermatozoen im weiblichen Genitaltrakt stellt der Eingang in die Eileiter dar. Nur 1:5.000 der Spermatozoen, die im Zervixmukus enthalten sind, können bis zum Eileiter vordringen. Am Ende des Weges durch den weiblichen Genitaltrakt findet man schließlich nur noch 5 - 100 Spermatozoen in beiden Eileitern (Doak et al. 1967). Nur eine dieser Spermatozoen kann dann die Oozyte befruchten.

Außer durch die Eigenbeweglichkeit der Spermatozoen wird die Spermatozoen-Migration zusätzlich durch andere Transportmechanismen gefördert, wie z.B. die muskuläre Kontraktibilität und die Zilien-Bewegung des Epithels des weiblichen Genitaltraktes. Die eigene Motilität der Spermatozoen ist jedoch hauptsächlich verantwortlich für ihre Wanderung über Vagina, Zervix und Uteruskavum bis hin zu den Eileitern. Von besonderer Bedeutung ist sie bei der Penetration des Cumulus oophorus, der Corona radiata und der Zona pellucida der Eizelle. Bei dieser Wanderung durch die Eihüllen spielt die bereits erwähnte "Whiplash"-Bewegung eine große Rolle. Diese charakteristische Veränderung der Motilität kapazitierter Spermatozoen, die sich in vivo vor allem am Ort der Befruchtung, also in der Ampulle abspielen dürfte, wird noch eingehend besprochen werden.

2.2.6 Energieversorgung der Spermatozoen

Die Spermatozoen-Motilität ist von einer dauerhaften Energieversorgung abhängig. Vor der Ejakulation werden vor allem Glukose und Fruktose als Energiequellen verbraucht. Nach der Ejakulation stehen den Spermatozoen zunächst vorwiegend Fruktose aus dem Seminalplasma und auf seinem weiteren Weg durch Uterus und Eileiter hauptsächlich die dort vorhandene Glukose zur Verfügung.

Die Glukose bzw. Fruktose wird in die Zelle aufgenommen und mittels Hexokinase in den Glykolyse-Weg eingeschleust. Bereits hier entsteht in mehreren Stoffwechselschritten ATP, das nun als Energiequelle vor allem für die Schwanzbewegung bereitsteht. Das während der Glykolyse entstehende Pyruvat wird in Acetyl-CoA umgewandelt. Dieses steht nun als Substrat für den Citratzyklus zur Verfügung. Dieser findet in den Mitochondrien statt. Dabei wird in mehreren Schritten - unter Einschaltung der Enzyme der Atmungskette - durch oxidative Phosphorylierung weiteres ATP gebildet.

Es muß immer ein ausreichender ATP-Pool als Energiequelle für die Spermatozoen-Motilität vorhanden sein. Durch einen chemo-mechanischen Transduktionsprozeß wird aus dem bereitstehenden ATP mittels enzymatischer Hydrolyse mechanische Energie gewonnen, die zu Kontraktionen der fibrillären Strukturen von Mittelstück und Schwanz und somit zur charakteristischen Propulsivbewegung der Spermatozoen führt.

2.3 Vorbereitung der Spermatozoen auf die Befruchtung der Eizelle

Die Motilität der Spermatozoen ist eine wesentliche Voraussetzung für die Fertilität eines Mannes; die Motilität allein stellt jedoch kein ausreichendes Kriterium für die Befruchtungsfähigkeit der Samenzellen dar. Sie ermöglicht zunächst den Transport der Spermatozoen von dem Ort der Freigabe zu dem Ort der Befruchtung. Doch für die Befruchtung selbst (und deren Störungen) sind Faktoren verantwortlich, die völlig unabhängig von der Fortbewegungsfähigkeit der Spermatozoen sind.

Frisch ejakulierte Spermatozoen sind zunächst noch nicht befruchtungsfähig. Da sie diese Fähigkeit erst nach einer gewissen Zeitspanne erlangen, galt dem Prozeß der Befähigung zur Befruchtung in den vergangenen Jahrzehnten ein reges Interesse. Der genannte Vorgang wird heute allgemein als Kapazitation bezeichnet. Spermatozoen, die diese Vorbereitungsphase für die Befruchtung in vivo oder in vitro abgeschlossen haben, also kapazitiert sind, sind fähig, bestimmte biochemische und morphologische Veränderungen am Akrosom einzugehen, die Akrosomreaktion genannt werden. Außerdem sind kapazitierte Spermatozoen befähigt, die hyperaktivierte Bewegungsform (= "Whiplash"-Bewegung) durchzuführen.

2.3.1 Kapazitation

2.3.1.1 Begriffserklärung

Der Begriff Kapazitation leitet sich vom englischen Wort capable (fähig) bzw. capacity (Fähigkeit) ab. Gemeint ist die Fähigkeit der Spermatozoen, eine Oozyte zu befruchten. "Capacitation" ist also am ehesten mit dem deutschen Wort "Befähigung" zu übersetzen und meint den Prozeß, den Spermatozoen durchmachen, bevor sie befruchtungsfähig werden.

Austin verwendete als erster den Begriff Kapazitation und verstand darunter eine gewisse physiologische Veränderung, der sich das Spermatozoon unterwerfen muß, bevor es zur Penetration des Eies befähigt ist (Austin 1952). Diese Definition schließt also alle Prozesse im Spermatozoon vor Erlangung der Befruchtungsfähigkeit ein. Inzwischen wurde von vielen Autoren die zunehmend erforschte Akrosomreaktion sowie die Hyperaktivierung von der Kapazitation an sich abgegrenzt, die deren Voraussetzung ist: So definiert Bavister die Kapazitation ausschließlich als Veränderungen, die das Spermatozoon nach dem Verlassen des männlichen Genitaltrakts und vor dem Auftreten der Akrosomreaktion durchmacht (Bavister 1973) und steht damit im Einklang mit den meisten Veröffentlichungen der vergangenen Jahre.

2.3.1.2 Die Entdeckung der Kapazitation

Im Jahre 1951 wurde erstmals beobachtet, daß Spermatozoen in den Eileitern eines Weibchens erst nach einer gewissen Zeit die Fähigkeit erlangen, eine Eizelle zu befruchten (Austin 1951, Chang 1951). Der physiologische Wandlungsprozeß, den die Spermatozoen während dieser Zeitspanne eingehen, wurde Kapazitation genannt (Austin 1952).

Bei den genannten Versuchen erfolgten sowohl die Kapazitation als auch die Befruchtung *in vivo*. Doch schon bald gelang die erste *In-vitro*-Fertilisation einer Eizelle nach *In-vivo*-Kapazitation der Spermatozoen im weiblichen Genitaltrakt (Thibault et al. 1954; Chang 1959). Diese Versuche stärkten somit die damalige Auffassung über die Notwendigkeit einer Kapazitation der Spermatozoen im weiblichen Genitaltrakt vor einer erfolgreichen Befruchtung der Eizelle.

Doch diese Auffassung mußte revidiert werden, als man entdeckte, daß die Kapazitation auch außerhalb lebender Organismen möglich ist (Yanagimachi und Chang 1963). Als Kapazitationsmedien dienten dabei zunächst körpereigene Sekrete und Flüssigkeiten, z.B. Eileiter- und Follikelflüssigkeit (Barros und Austin 1967; Barros 1968; Yanagimachi 1969 a; Iwamatsu und Chang 1969), später auch chemisch definierte Medien (Toyoda et al. 1971, Miyamoto und Chang 1973; Toyoda und Chang 1974).

Auch an menschlichen Eizellen gelang eine *In-vitro*-Befruchtung durch präinkubierte Spermatozoen (Edwards et al. 1969).

2.3.1.3 Kapazitationszeit

Über die genaue Zeitdauer gab es lange Zeit nur vage Angaben bzw. Vermutungen. Beim Menschen nahm man zunächst auch eine relativ lange Kapazitationsdauer von etwa 7 Stunden an (Austin et al. 1973). Heute geht man von einer wesentlich kürzeren Kapazitationszeit aus. Reyes und Mitarbeiter (1984) beobachteten z.B. bei der Beurteilung der menschlichen Akrosomreaktion mit der "Triple-stain-Methode" nach 2 Stunden keine weitere Zunahme akrosomen-reagierter Spermatozoen. Das würde bedeuten, daß die Kapazitation beim Menschen nach 2 Stunden abgeschlossen ist, was allerdings aufgrund unserer Ergebnisse nicht bestätigt werden kann.

Von großer Bedeutung ist dabei die Beobachtung, daß Spermatozoen nach Ende einer fixen Kapazitationszeit nicht alle synchron in den kapazitierten Zustand übergehen, sondern daß die Anzahl kapazitierter Spermatozoen in einen gewissen Zeitraum langsam zunimmt. Bedford (1983) spricht von einer "Asynchronie der Akrosomreaktion in vitro und in vivo innerhalb jeder Spermatozoenpopulation". Diese Heterogenität einer kapazitierenden Spermatozoenpopulation mit einer über mehrere Stunden verteilt einsetzenden Akrosomreaktion fand man sowohl in vitro (Yanagimachi und Usui 1974; Barros 1974; Talbot und Franklin 1976; Rogers 1981; Dudenhausen und Talbot 1981), als auch in vivo (Overstreet und Cooper 1979; Cummins 1982; Cummins und Yanagimachi 1982). Auf diese Weise steht in der Ampulle über eine relativ lange Zeit ein Reservoir reaktions- und befruchtungsfähiger Spermatozoen zur Verfügung, wodurch die Chance einer Befruchtung der Eizelle erhöht wird.

Doch nicht nur zwischen den einzelnen Spermatozoen einer Population, sondern auch zwischen den einzelnen Individuen einer Gattung wurden - insbesondere beim Menschen - deutliche Unterschiede bezüglich der Kapazitationsdauer beobachtet. Bei Untersuchungen von Perrault und Rogers (1982 a) zeigten z.B. einige Spender ihre maximale Fertilisationskapazität bereits nach 2 Stunden, andere erst 6 Stunden nach Ejakulation oder sogar später.

Heute geht man davon aus, daß die durchschnittliche Kapazitationszeit beim Menschen ähnlich wie bei den meisten Säugetierarten etwa 2 bis 4 Stunden beträgt.

2.3.1.4 Biochemische Vorgänge während der Kapazitation

Dem Kapazitationsprozeß sind bisher keine morphologischen oder biochemischen Veränderungen sicher zuzuordnen. Einige Autoren brachten zwar bestimmte Membranveränderungen mit der Kapazitation in Verbindung. Ein eindeutiger Zusammenhang konnte jedoch nicht bewiesen werden (Austin 1975; Yanagimachi 1981).

Bedford (1983) stellt daher fest, daß "die molekulare Natur der primären Veränderungen, die für die Kapazitation verantwortlich sind, im Dunkeln bleibt"

2.3.1.5 Biochemische Voraussetzungen für die Kapazitation in vitro

Seit Beginn der In-vitro-Fertilisation von Oozyten widmeten sich zahlreiche Untersuchungen der Frage, welche Substanzen in welchen Konzentrationen im Inkubationsmedium vorhanden sein müssen, um die Kapazitation (und Akrosomreaktion) von frisch gewonnenen Spermatozoen zu ermöglichen. Da die biochemischen Voraussetzungen für Kapazitation und Akrosomreaktion bis auf wenige Unterschiede identisch sind, werden sie gemeinsam abgehandelt.

Schon seit den ersten In-vitro-Fertilisationen in künstlichen Medien war die Bedeutung des Serumalbumins bekannt (Pickworth und Chang 1969; Miyamoto und Chang 1973). Bei physiologischem pH sind Kapazitation und Akrosomreaktion ohne Anwesenheit von Proteinen nicht möglich (Hyne und Garbers 1981). Für Versuche an menschlichen Spermatozoen werden vorwiegend humanes und bovines Serumalbumin verwendet.

Der Einfluß von Calciumionen auf Kapazitation und Akrosomreaktion ist Gegenstand zahlreicher Experimente gewesen. Wenn Spermatozoen vom Meerschweinchen in Abwesenheit von Calcium eine gewisse Zeit inkubiert werden, die für die Kapazitation ausreichend ist, beobachtet man, daß innerhalb von wenigen Minuten nach Zugabe von Calcium ein großer Teil der Spermatozoen die Akrosomreaktion eingeht (Yanagimachi und Usui 1974). Das bedeutet, daß Calcium nicht für die Kapazitation an sich, sondern nur für die Akrosomreaktion bzw. für das letzte Stadium der Kapazitation kurz vor der Akrosomreaktion benötigt wird. Die Spermatozoen waren somit bei Zufuhr des Calciums bereits kapazitiert. Die Akrosomreaktion ist jedoch ohne Calcium nicht möglich (Yanagimachi und Usui 1974; Talbot et al. 1976).

In Abwesenheit von Glukose können weder Akrosomreaktion noch "Whiplash"-Bewegung beobachtet werden (Fraser und Quinn 1981). Nach Zugabe von Glukose am Ende einer zweistündigen Präinkubation ohne Glukose fand jedoch innerhalb von 5 Minuten eine Akrosomreaktion statt, die mit der Reaktion derjenigen Proben äquivalent war, die von Anfang an mit Glukose inkubiert worden waren. Diese Versuche zeigen, daß die Kapazitation mit Ausnahme der terminalen Phase in Abwesenheit von Glukose möglich ist.

Pyruvat und Laktat üben ebenfalls eine fördernde Wirkung auf die Akrosomreaktion aus, und zwar sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Glukose (Rogers und Yanagimachi 1975; Bavister und Yanagimachi 1977; Dravland und Meizel 1981; Mujica und Ruiz 1983).

Von sehr großer Bedeutung für die Auslösung der Akrosomreaktion ist die Wasserstoffionenkonzentration (pH) des Inkubationsmediums. Vermutlich sind eine Reihe von Untersuchungen über die Akrosomreaktion dadurch verfälscht worden, daß sie unter unkontrollierten pH-Bedingungen durchgeführt wurden; denn eine isolierte pH-Verschiebung kann bereits eine Akrosomreaktion auslösen (Bedford 1983).

Während die Kapazitation und Akrosomreaktion bei pH-Werten unter 7,8 nur in Anwesenheit von Serumproteinen abläuft, ist im alkalischen pH-Bereich über 7,8 die Akrosomreaktion sogar in einem minimalen Kulturmedien ohne Proteine zu beobachten (Hyne und Garbers 1981). Bei pH 8,3 - 8,4 war die Akrosomreaktion unter diesen Bedingungen bereits nach 30 Minuten nachweisbar und hatte nach zwei Stunden ihr Maximum erreicht, während bei pH 10,5 etwa 85 % der Spermatozoen bereits nach 5 Minuten reagiert waren. Alkalischer pH kann demnach eine schnelle Akrosomreaktion auslösen. Die Kapazitationszeit ist also verkürzt. Als Ursache hierfür wird eine veränderte Calcium-Permeabilität der Spermatozoen-Membran diskutiert, was durch die Beobachtung bestätigt wird, daß auch bei alkalischen pH-Werten eine Akrosomreaktion bei Abwesenheit von Calcium nicht auftritt (Hyne und Garbers 1981). Die Änderung der Permeabilitätseigenschaften führt zu einem Calcium-Einstrom in die Zelle. Eine kritische intrazelluläre Calcium-Konzentration wiederum induziert die Akrosomreaktion (Fraser 1982, Bedford 1983).

Dieser Calcium-Einstrom kann im Experiment künstlich stark beschleunigt werden, indem man dem Medium Jonophor A 23187 zugibt (Talbot et al. 1976; Singh et al 1978; Green 1978 a; Fraser 1982). Jonophor, ein bivalentes Metallkation, verkürzt die Kapazitationsdauer auf einen Bruchteil der normalen Zeit. Einen ähnlichen Effekt haben Detergentien oder Komplement (Yanagimachi 1975).

Kapazitation und Akrosomreaktion sind außerdem abhängig von der Temperatur des Inkubationsmediums. Am günstigsten ist der physiologische Temperaturbereich um 37° C (Shams-Borhan und Harrison 1981; Lambert 1981).

Zusammenfassend ist festzuhalten, daß bei physiologischen pH-Verhältnissen (pH 7.8) die Anwesenheit von Serumproteinen für die Kapazitation und Akrosomreaktion obligatorisch ist. Glukose und möglicherweise Calciumionen sind für den Kapazitationsvorgang an

sich nicht, sondern erst für die Akrosomreaktion selbst erforderlich. Dagegen erfolgen bei alkalischen pH ($> 7,8$) Kapazitation und Akrosomreaktion auch in Abwesenheit von Serumproteinen.

2.3.1.6 Die Bedeutung der Kapazitation

Die Kapazitation hat die Aufgabe, das Spermatozoon auf die Befruchtung der Eizelle vorzubereiten. Zu diesem Zweck muß die Samenzelle zunächst fähig werden, die Akrosomreaktion und die "Whiplash"-Bewegung einzugehen. Diese Fähigkeit erlangt das Spermatozoon, nachdem es sich bestimmten, bisher weitgehend unbekannten zellulären Veränderungen unterzogen hat. Diese ermöglichen einen Calciumeinstrom in die Zelle, wodurch dann die Akrosomreaktion ausgelöst wird. Auch die "Whiplash"-Bewegung ist erst möglich, wenn die intrazelluläre Calcium-Konzentration einen bestimmten Schwellenwert überschritten hat (Fraser 1982, Shams-Borhan und Harrison 1981).

Das Phänomen der Kapazitation konnte bei Wirbellosen (z.B. Seeigel) nicht beobachtet werden. Dabei bleibt die Frage offen, ob bei den Wirbellosen ein ähnlicher Prozeß in sehr kurzer Zeit abläuft und daher nicht nachweisbar ist. Doch auch beim Seeigel gibt es eine Akrosomreaktion. Im Gegensatz zu den Wirbeltieren wird die Akrosomreaktion bei den Wirbellosen durch spezifische Faktoren der Eizelle (jelly coat) in Anwesenheit von Calcium ausgelöst. Dies geschieht an oder nahe der Oberfläche der Eizelle (Metz 1967). Die Möglichkeit, daß ein vergleichbarer Eifaktor in den Oozyten von Säugetieren vorhanden sein könnte, ist oft diskutiert worden (Bishop und Tyler 1956; Bedford 1970 b; Austin et al. 1973; Meizel 1978). Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse hat die Eizelle der Säuger jedoch nicht mehr die Aufgabe, die Akrosomreaktion zu stimulieren und zu koordinieren (Bedford 1983). Stattdessen wird das Einsetzen der Akrosomreaktion bei den Säugerspermatozoen von autonomen Regulationsmechanismen bestimmt.

Die Kapazitation, die offensichtlich bei den Säugern erstmals während der Evolution aufgetreten ist, ist vermutlich Ausdruck dieser neu erworbenen Fähigkeit der Säuger-Spermatozoen, ihre Akrosomreaktion selbst zu steuern. Diese evolutionäre Neuerung dürfte im Zusammenhang stehen mit parallel erfolgten morphologischen Veränderungen an Ei- und Samenzelle sowie mit einer veränderten Art ihrer Interaktion während der Befruchtung, die ja bei den Säugetieren nicht mehr im Seewasser, sondern in körpereigenen Sekreten stattfindet (Bedford 1983).

Die Säugetier-Spermatozoen steuern wahrscheinlich nicht nur ihre Akrosomreaktion selbst, sondern auch das Einsetzen der "Whiplash"-Bewegung, die für die Penetration der auffallend dicken Hüllen der Säugetier-Eier erforderlich ist (Bedford 1983).

Ein weiteres Ergebnis dieser autonomen Selbstregulation ist die bereits erwähnte Asynchronie innerhalb einer Spermatozoenpopulation. Das unterschiedliche Einsetzen der Akrosomreaktion bei den einzelnen Spermatozoen führt zu einer größeren Flexibilität, die der in vivo-Situation angepaßt ist (Bedford 1983).

Das bedeutet, daß Säugetier-Spermatozoen als neue evolutionäre Errungenschaft die Möglichkeit besitzen, das Auftreten der Akrosomreaktion und des hyperaktivierten Zustandes ("Whiplash"-Bewegung) unabhängig von der Eizelle selbst zu regulieren. Die zellulären Vorgänge, die zu dieser Selbststeuerung führen, nennt man Kapazitation.

2.3.2 Akrosomreaktion

2.3.2.1 Begriffserklärung

"Die Akrosomreaktion geht mit einer offensichtlichen morphologischen Veränderung der Spermatozoen während ihres Aufenthaltes im weiblichen Genitaltrakt einher" (Chang 1984). Diese morphologischen Veränderungen können mit Hilfe des Elektronenmikroskopes, bei bestimmten Tierspezies auch im Lichtmikroskop sichtbar gemacht werden.

Nur kapazitierte Spermatozoen können die Akrosomreaktion eingehen. Daher ist eine Akrosomreaktion in vitro nur möglich, wenn die bereits erwähnten Voraussetzungen für die Kapazitation erfüllt sind.

2.3.2.2 Entdeckung der Akrosomreaktion

Zunächst wurde die Akrosomreaktion bei den Wirbellosen entdeckt. Die Spermatozoen des Seeigels gehen beim Kontakt mit der Gallert-hülle der Eizelle die Akrosomreaktion ein (Dan 1952, 1956).

Die Rolle des Akrosoms von Säugetier-Spermatozoen während der Befruchtung wurde erstmals von Austin und Bishop (1958) mit dem Phasenkontrastmikroskop untersucht. Sie kamen zu dem Schluß, daß "das Akrosom eine Veränderung durchmacht, während die Spermatozoen durch den weiblichen Genitaltrakt wandern, und abgelöst wird, bevor die Spermatozoen in die Zona pellucida eindringen".

2.3.2.3 Morphologische und biochemische Vorgänge während der Akrosomreaktion

Mit Hilfe des Elektronenmikroskops konnten die ultrastrukturellen Veränderungen während der Akrosomreaktion genauer untersucht werden. Es wurde eine Membranvesikulation beobachtet, die auf multiple Fusionen der Plasmamembran mit der darunterliegenden äußeren akrosomalen Membran zurückgeführt wurde (Piko und Tyler 1964; Barros et al. 1967; Bedford 1968).

Bei bestimmten Tierspezies resultiert die Akrosomreaktion in einem lichtmikroskopisch erkennbaren Verlust des Akrosoms. Die Spermatozoen des Meerschweinchens weisen beispielsweise ein sehr auffallendes, deutlich sichtbares Akrosom auf. Hier zeigt sich nach 14 bis 18 Stunden Inkubation ein völliges Verschwinden der akrosomalen Kappen. Diese kapazitierten und akrosomenreagierten Spermatozoen sind dann fähig, die Eizelle sofort zu penetrieren (Yanagimachi 1972).

Bei den strukturellen Veränderungen am Akrosom von Säugetier-Spermatozoen werden zwei Typen unterschieden:

1. Die eigentliche, "wahre" Akrosomreaktion, die durch eine Fusion der Plasmamembran mit der äußeren akrosomalen Membran charakterisiert ist (Barros et al. 1967).
2. Eine "falsche" akrosomale Reaktion, die auch "unspezifische Degeneration" des Akrosoms genannt wird (Bedford 1970 a; Jones 1973). Hier handelt es sich um einen akrosomalen Desintegrationsprozeß mit Vakuolenbildung, der mit Alterungsvorgängen und Absterben der Spermatozoen in Verbindung gebracht wird.

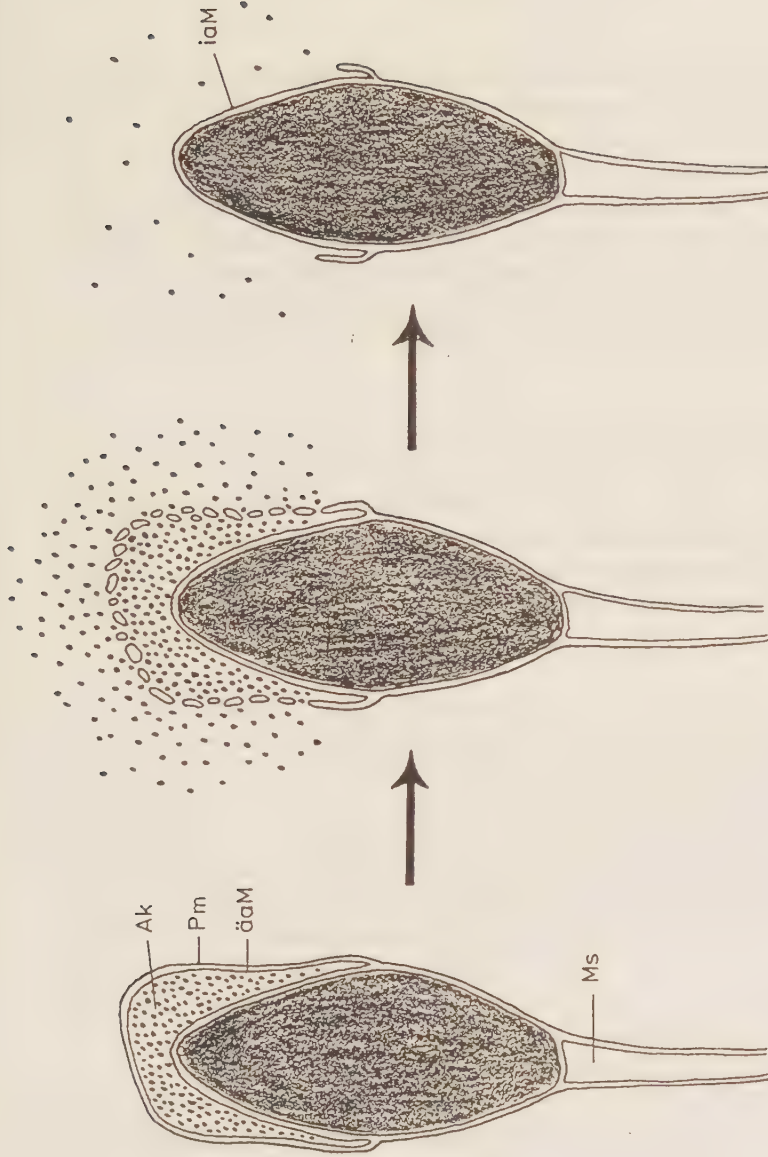


Abb. 2: Schema der Akrosomenreaktion.
Links: Schwellung des Akrosoms (Ak). Mitte: Vesikulation durch multiple Fusionen zwischen Plasmamembran (Pm) und äußerer akrosomaler Membran (ääM). Freisetzung der akrosomalen Enzyme. Rechts: Verlust des Akrosoms. Die innere akrosomale Membran (iaM) bleibt intakt. Ms = Mittelstück.

Die Akrosomreaktion beginnt mit einer Schwellung des Akrosoms. Bei den meisten Säugetierarten, so auch beim Menschen, kommt es nun zu multiplen Fusionen zwischen Plasmamembran und äußerer akrosomaler Membran. Dabei werden die beiden Membranen durch eine Kette von Vesikeln ersetzt. Gleichzeitig wird der Inhalt des Akrosoms (die akrosomale Matrix) nach außen freigesetzt (Shams-Borhan und Harrison 1981). Schließlich kommt es zu einer zunehmenden Desintegration des Akrosoms, wobei die innere akrosomale Membran, die den Nukleus bedeckt, intakt bleibt (Abb. 2).

Über den Mechanismus der Vesikulation ist bisher wenig bekannt. Möglicherweise handelt es sich um einen Vorgang, der der Endozytose ähnelt. Doch es ist wahrscheinlicher, daß die Vesikulation durch Veränderungen des physikalischen oder chemischen Zustandes der Membran ausgelöst wird (Shohet 1972; Shams-Borhan und Harrison 1981).

Über die Auslösung der Akrosomreaktion gibt es unterschiedliche Vorstellungen. Wie bereits erwähnt, spielt dabei der Calcium-Einstrom in die Zelle vermutlich eine entscheidende Rolle. Es wurde diskutiert, ob Calciumionen an der Aktivierung von Proakrosin zu Akrosin zu Beginn der Akrosomreaktion beteiligt sein könnten (Meizel 1978). In intakten Spermatozoen liegt Akrosin nämlich nur in seiner inaktiven Form, als Proakrosin, vor (Brown und Harrison 1978). Es geht zu Beginn der Akrosomreaktion in seine aktive Form über (Green 1978 b) und spielt vermutlich sogar eine wichtige Rolle bei der Auslösung der Akrosomreaktion (Meizel und Lui 1976, Lui und Meizel 1979).

Eine weitere Möglichkeit ist, daß Calciumionen verantwortlich für die Aktivierung des Adenylatzyklase-cAMP-Systems sind, das über einen cAMP-Anstieg zur Auslösung der Akrosomreaktion führt. So führt eine Calcium-Exposition zu erhöhten cAMP-Spiegeln, und in Anwesenheit von cAMP wird das Auftreten der Akrosomreaktion

beschleunigt (Hyne und Garbers 1979 a, b; Morton et al. 1974; Fraser 1981; Perreault und Rogers 1982 b).

Die spezifischen Funktionen der Calciumionen, des Akrosins und des cAMP bei der Induktion der Akrosomreaktion bleiben jedoch unklar.

2.3.2.4 Biochemische Voraussetzungen für die Akrosomreaktion in vitro

Die biochemischen Bedingungen, die die Kapazitation und die Akrosomreaktion ermöglichen, wurden bereits im Kapitel 2.3.1.5 besprochen.

2.3.2.5 Ablauf der Akrosomreaktion in vivo

In den vergangenen Jahren gab es einige Untersuchungen, die sich mit der Frage befaßten, ob die Akrosomreaktion, die in vivo zur Befruchtung führt, vor dem ersten Kontakt mit der Eizelle, während der Penetration des Cumulus oophorus oder erst an der Zona pellucida erfolgt.

Man nimmt an, daß zumindest bei einigen Säugetierspezies die Spermatozoen die Akrosomreaktion vor der Penetration der Eihüllen durchmachen (Yanagimachi 1978; Huang et al. 1981; Yanagimachi et al. 1983).

Bei der Mehrzahl der Studien zeigte sich jedoch, daß die Akrosomreaktion penetrierender Spermatozoen erst an der Zona-Oberfläche abläuft (Gwatkin et al. 1976; Szöllösi und Hunter 1978; Florman und Storey 1982). Crozet und Dumont (1984) fanden bei einer Untersuchung der in vivo-Penetration von Schaf-Oozyten an der Zona-Oberfläche der penetrierten Eizellen Reste der zerfallenen akrosomalen Kappen, die dort liegengeblieben waren. Daraus schlossen sie ebenfalls, daß die Akrosomreaktion an der Oberfläche der Zona pellucida stattfindet.

Auch Yanagimachi und Phillips (1984) untersuchten den Zustand des Akrosomen von Hamster-Spermatozoen kurz vor der Befruchtung in vivo. Dabei zeigte sich, daß die Spermatozoen, die sich noch in der ampullären Flüssigkeit befanden, akrosomen-intakt waren, während die große Mehrheit der den Cumulus penetrierenden Spermatozoen deutlich veränderte akrosomale Kappen aufwies. Die meisten Spermatozoen, die den Cumulus durchwandert und die Zona-Oberfläche erreicht hatten, wiesen noch Reste ihrer akrosomalen Kappen auf ("acrosomal ghosts"). Die Akrosomenkappen wurden bei der Penetration der Zona an der Oberfläche zurückgelassen. Diese Beobachtungen führten zu der Schlußfolgerung, daß "das befruchtende Spermatozoon ... die Akrosomreaktion eingeht, während es den Cumulus durchwandert".

Demnach beginnt also die Akrosomreaktion der befruchtenden Spermatozoen während der Penetration des Cumulus und wird an der Zona-Oberfläche abgeschlossen (Abb. 3). Eine Akrosomreaktion außerhalb der Eihüllen würde nach diesem Modell nicht zur Befruchtung führen.

Die Rezeptoren, mit denen sich die Spermatozoen an die Zona pellucida anheften, sind weitgehend unbekannt. Es werden z.B. die innere akrosomale Membran und das Äquatoralsegment als potentielle Bindungsstellen diskutiert (Yanagimachi 1977, 1981). Die akrosomalen Reste ("ghosts") scheinen bei der Fixation der Spermatozoen an die Zona ebenfalls eine wichtige Rolle zu spielen (Yanagimachi und Phillips 1984).

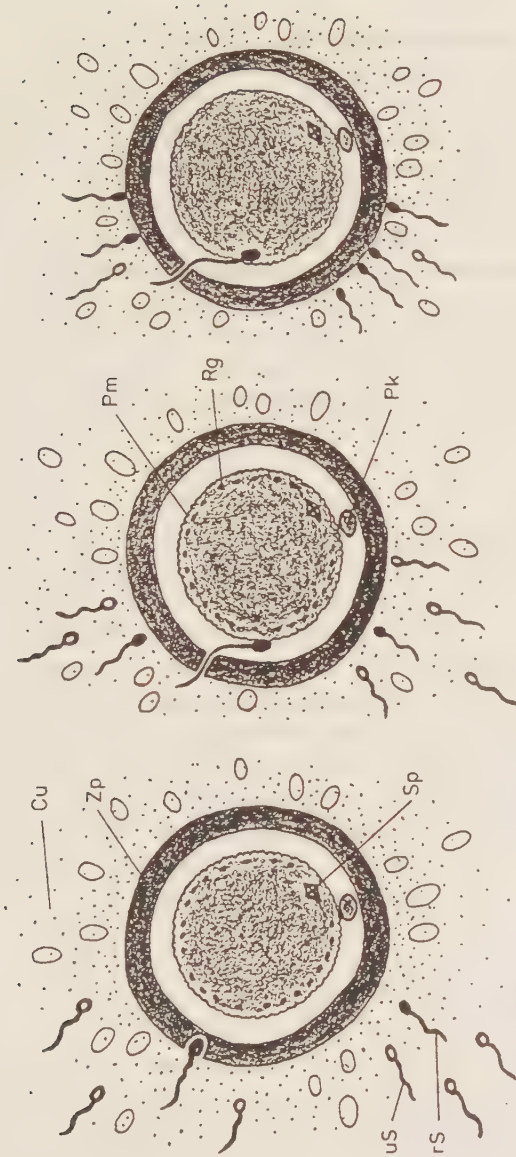


Abb. 3: Befruchtung der Eizelle.

Links: Unbefruchtete (US) und befruchtete Eizelle (Rg) wandern durch den Cumulus oophorus (Cu). Ein befruchtetes Spermatozoon dringt bereits in die Zona pellucida (Zp) der Eizelle ein. Mitte: Das Spermatozoon hat die Zona penetriert und nimmt Kontakt mit der Plasmamembran (Pm) der Eizelle auf. Es kommt zur Verschmelzung der beiden sich berührenden Zellmembranen. Rechts: Das Spermatozoon ist in die Eizelle eingedrungen. Um eine Polyspermie der Eizelle zu vermeiden, werden nun die nachfolgenden Spermatozoen am Eindringen gehindert. Hierfür sind die unter der Plasmamembran gelegenen Rindengranula (Rg) der Eizelle verantwortlich, deren Inhalt in den perivitellinen Raum abgegeben wird und eine Strukturveränderung der Zona pellucida bewirkt. Nach Beendigung der 2. Reifeteilung der Oozyte kommt es nun zur Vereinigung des weiblichen und männlichen Kernmaterials. Pk = Polkörperchen. Sp = Spindel der 2. Reifeteilung der Oozyte.

2.3.2.6 Bedeutung der Akrosomreaktion

Es wird allgemein angenommen, daß die akrosomalen Enzyme, die durch die Akrosomreaktion wirksam werden können, in Verbindung mit der starken Schwanzbewegung der Spermatozoen die Voraussetzung für eine erfolgreiche Penetration der Eihüllen sind (Yanagimachi und Phillips 1984; Bedford und Cooper 1978; Meizel 1978; Yanagimachi 1981). Außerdem scheint die vermutete Bindungsstelle der Spermatozoen erst durch das Ereignis der Akrosomreaktion zur Fusion mit der Plasmamembran der Eizelle befähigt zu werden (Yanagimachi und Noda 1970; Barros und Berrios 1977).

2.3.3 Die Hyperaktivierung ("Whiplash"-Bewegung)

Neben Kapazitation und Akrosomreaktion ist das dritte wichtige Phänomen, das die Spermatozoen im Zuge ihrer Vorbereitung auf die Befruchtung der Eizelle aufweisen, der hyperaktivierte Bewegungstyp der Spermatozoen. Für dieses Bewegungsmuster werden die Begriffe "Whiplash"-Bewegung (Katz et al. 1978, Katz und Yanagimachi 1980, Frazer 1977, Johnson et al. 1981), "large amplitude movement" (Yanagimachi 1970, Katz et al. 1978, Katz und Yanagimachi 1980) und "hyperactivation" (Yanagimachi 1969 a, b, 1970, 1981, Cummins 1982, Bedford 1983) synonym verwendet.

2.3.3.1 Begriffserklärung

Die "Whiplash"-Bewegung ist - wie bereits erwähnt - charakterisiert durch außerordentlich kräftige Schwanzbewegungen mit einer gesteigerten Amplitude der Schwanzwellen. Bemerkenswert ist außerdem die Asymmetrie des Bewegungsbildes (Cummins 1982). Durch die weit ausholenden Schwanzbewegungen kommt es dabei zu

einer auffallend starken schlagsynchronen Seitwärtsverschiebung des Kopfes ("lateral head displacement"). Diese ist auch bei der Progressivbewegung frisch ejakulierter Spermatozoen in geringem Maß vorhanden, jedoch bei der "Whiplash"-Bewegung weit stärker ausgeprägt (Suarez et al. 1983).

Nur kapazitierte Spermatozoen sind zur "Whiplash"-Bewegung befähigt (Yanagimachi 1981).

2.3.3.2 Entdeckung der "Whiplash"-Bewegung

Zunächst stellte man fest, daß die Sauerstoffaufnahme und die glykolytische Aktivität der Spermatozoen nach 6 Stunden Inkubation in utero gegenüber den Ausgangswerten stark zunahm (Hamner und Williams 1963; Mounib und Chang 1964).

Das hyperaktivierte Motilitätsmuster wurde erstmals von Yanagimachi beim Goldhamster beobachtet (1969 a) und beschrieben (1970). Ein ähnlicher Bewegungstyp konnte bei zahlreichen anderen Tierarten nachgewiesen werden (z.B. Yanagimachi 1972; Barros et al. 1973; Mahi und Yanagimachi 1976; Fraser 1977; Cooper et al. 1979; Cummins 1982).

Es ist schwierig, aus diesen Berichten zu entnehmen, ob die Hyperaktivierung der Spermatozoen vor oder nach der Akrosomreaktion abläuft (Chang 1984). Doch vermutlich können Akrosomreaktion und Hyperaktivierung unabhängig voneinander in Erscheinung treten und sollten als getrennte Phänomene aufgefaßt werden (Yanagimachi 1981).

2.3.3.3 Biochemische Voraussetzungen für die "Whiplash"-Bewegung in vitro

Da zur "Whiplash"-Bewegung nur kapazitierte Spermatozoen befähigt sind, müssen die biochemischen Voraussetzungen gegeben sein, die die Kapazitation ermöglichen (siehe Kap. 2.3.1.5.).

Eine Erhöhung der Osmolarität durch Elektrolyte (nicht aber durch Nichtelektrolyte) führt zu einer starken Zunahme der "Whiplash"-Bewegung (Cooper 1984).

Anwesenheit von Calcium ist eine Voraussetzung für das Einsetzen, nicht jedoch für die Aufrechterhaltung der Hyperaktivtion. Durch Jonophor A 23187, das einen schnellen Calcium-Einstrom in die Zelle bewirkt, wird die Kapazitationszeit kapazitierender Spermatozoen abgekürzt und die "Whiplash"-Bewegung bereits kapazitierter Spermatozoen deutlich gesteigert (Fraser 1982; Cooper 1984).

Das Einsetzen der Hyperaktivtion erfordert außerdem die Anwesenheit von Glukose (Fraser und Quinn 1981, Cooper 1984).

2.3.3.4 Ablauf der "Whiplash"-Bewegung in vivo

In den vergangenen Jahren beschäftigten sich mehrere Studien mit den Bewegungscharakteristika der Spermatozoen in vivo.

Da die Wand der Eileiterampulle beim Hamster so dünn und transparent ist, daß der Ampulleninhalt von außen beobachtet werden

kann, gelang es Katz und Yanagimachi (1980) die Bewegungsmerkmale der Spermatozoen direkt am Ort der Befruchtung zu untersuchen. Sie beobachteten dabei, daß Perioden der "Whiplash"-Bewegung, in der die Spermatozoen sich ohne großen Raumgewinn fortbewegten, von Perioden unterbrochen wurden, in denen sie ein progressives Bewegungsmuster mit geringerer Amplitude aufwiesen. Dieses biphasische Motilitätsschema wurde zunächst in weiteren Studien bestätigt (Overstreet et al. 1980; Johnson et al. 1981), jedoch von denselben Forschern später wieder in Frage gestellt (Suarez et al. 1983).

Bei in vitro-Bindung von Spermatozoen an die Zona pellucida cumulus-loser Eizellen geht ihre asymmetrische, wenig zielgerichtete "Whiplash"-Bewegung in eine symmetrische Bewegungsform mit großer Amplitude über, die vermutlich der Maximierung des Drucks auf die Zona dient und so die Penetration erleichtern soll (Katz und Yanagimachi 1981).

Bei genauerer Untersuchung der "Whiplash"-Bewegung von Spermatozoen, die aus der Eileiterampulle gewonnen worden waren, wurde festgestellt, daß diese durch ihre asymmetrische Bewegungsart sich ständig auf kreisförmigen Bahnen bewegten. Diese kreisenden Spermatozoen wiesen noch intakte akrosomale Kappen auf (Cummins 1982).

Ähnliche Beobachtungen machten Suarez und Mitarbeiter (1983), die postkoital Spermatozoen aus Kaninchen-Eileitern gewannen und deren Bewegungsmuster beurteilten. Fast alle frei schwimmenden Spermatozoen schwammen auf kreisförmigen Bahnen. Das Schlagmuster dieser kreisenden Spermatozoen war whiplash-artig, asymmetrisch und fast in einer Ebene gelegen. Der Motilitätstyp der Spermatozoen, die sich in der Cumulusmasse bewegten, war dagegen langsam, unregelmäßig und schlängelnd. Im Vergleich dazu schwammen frisch ejakulierte Spermatozoen auf linearen Bahnen, die auf ein relativ symmetrisches Schlagmuster zurückzuführen sind.

2.3.3.5 Die Bedeutung der "Whiplash"-Bewegung

"Die Bedeutung der hyperaktivierten Motilität für die Befruchtung ist noch recht ungewiß", stellt Bedford (1983) in seiner Übersichtarbeit zum Thema Kapazitation, Akrosomreaktion und Hyperaktivierung fest.

Die Frage nach der Funktion der "Whiplash"-Bewegung ist also (ähnlich wie die der Akrosomreaktion) auch heute noch nicht endgültig geklärt. In den Studien der vergangenen Jahre, in denen diese Frage diskutiert wurde, kristallisieren sich jedoch v.a. zwei mögliche Aufgaben der "Whiplash"-Bewegung heraus:

1. Die Hyperaktivierung könnte die Chance der wenigen sich in der Ampulle befindenden Spermatozoen erhöhen, mit der Eizelle in Berührung zu kommen (Katz et al. 1978; Suarez et al. 1983).
2. Die Hyperaktivierung ist vermutlich für eine erfolgreiche Penetration der Eihüllen erforderlich, da sie die Spermatozoen befähigt, mit großem Druck in die Eimasse einzudringen (Katz und Yanagimachi 1980; Bedford 1983; Yanagimachi und Phillips 1984).

Zu 1 Der Übergang von der prähyperaktivierten (= postejakulatorischen) zur hyperaktivierten Motilität ist nicht einfach durch eine Zunahme der Amplitude bedingt, sondern er hat auch eine Veränderung der Schlagsymmetrie zu Folge, die dazu führt, daß die Spermatozoen sich auf kreisförmigen Bahnen bewegen. Da prähyperaktivierte Spermatozoen große Entfernungen zurücklegen müssen, während sie Vagina, Cervix und Uterus durchwandern, ist für sie eine lineare Schwimmbahn die geeignetste. Doch sobald sie in der Ampulle angelangt sind, müssen sie in dem engen, faltenrei-

chen ampullären Lumen bleiben. Falls, wie vermutet, der Übergang in die hyperaktivierte Motilität hier in der Ampulle stattfindet, könnte durch die zirkulären Bewegungen ein allzu großer Verlust der Spermatozoen vom Ort der Befruchtung verhindert werden. Außerdem würden die kreisenden Bewegungen die Chance bei der Suche nach der Cumulusmasse erhöhen. Spermatozoen, die im zentralen Lumen der Ampulle in kleinen Kreisen schwimmen, werden sich zudem weniger wahrscheinlich in den Krypten des Ampullenepithels verfangen als linear schwimmende Spermatozoen (Suarez et al. 1983).

Zu 2 Zwischen der hyperaktivierten Motilität und der Fähigkeit der Spermatozoen, Eizellen zu penetrieren, konnte eine Korrelation hergestellt werden (Fraser 1981). Außerdem nimmt durch die Hyperaktivierung die "hydrodynamische Antriebsleistung" der Spermatozoen um ein Vielfaches zu (Johnson et al. 1981). Allerdings ist nichts darüber bekannt, um wieviel dadurch der tatsächliche Druck der Spermatozoen auf die Cumulusmasse zunimmt und wie die Spermatozoen diesen Druck an die wechselnden Bedingungen (Übergang von der Ampullenflüssigkeit in die Cumulusmasse und dann zur Zona pellucida) anpassen (Bedford 1983). Dennoch ist die Drucksteigerung durch die "Whiplash"-Bewegung ein "notwendiges Element für die Penetration der Eihüllen" (Bedford 1983).

2.4 Klinische Anwendung

2.4.1 Möglichkeiten einer Beurteilung der Befruchtungsfähigkeit menschlicher Spermatozoen

Leider sind die Techniken, die in der andrologischen Routine-Untersuchung angewendet werden, so wenig sensibel, daß daraus die Diagnose männliche Infertilität nur in Ausnahmefällen (z.B. bei Azoospermie) abgeleitet werden kann (Aitken 1983, Aitken et

al. 1983). Gewöhnlich reichen die verwendeten Parameter (Dichte, Morphologie und Motilität der Spermatozoen) nicht aus, um von ihnen mit hinreichender Sicherheit auf die Befruchtungsfähigkeit der untersuchten Spermatozoen schließen zu können. Die geringe Aussagekraft dieser konventionellen Kriterien ist wiederholt aufgezeigt worden (Van Zyl et al. 1975, Smith et al. 1977, Hermanns und Hafez 1981). Daher besteht eine dringende Notwendigkeit, andere, funktionale Tests zu entwickeln, mit denen die Fähigkeit menschlicher Spermatozoen zur Erzeugung einer Schwangerschaft gemessen werden kann. In diesem Sinn sind seit Jahren eine Reihe neuer und verbesserter Techniken entwickelt worden, mit deren Hilfe die tatsächliche Fähigkeit menschlicher Spermatozoen, durch den weiblichen Genitaltrakt zu wandern und die Eizelle zu befruchten, untersucht werden kann.

Ein wichtiger Schritt in diese Richtung war die Einführung des bereits erwähnten Penetrationstests mit zona-losen Hamstereiern ("zona-free hamster egg penetration test") durch Yanagimachi und Mitarbeiter (1976). Er basiert darauf, daß der Eizelle durch Entfernung der Zona pellucida ihre speziesspezifische Barriere genommen wird. Dadurch können kapazitierte Spermatozoen anderer Säugetierarten einschließlich des Menschen in die Hamstereizellen eindringen (Yanagimachi 1981).

Der Penetrationstest mit zona-losen Hamstereiern (kurz: "Hamstertest") erlaubt eine Beurteilung der Penetrationsfähigkeiten menschlicher Spermatozoen während der Befruchtung. Dazu gehören die Kapazitation, die Akrosomreaktion, die Fusion mit der vitellinen Membran (= Plasmamembran, die durch Entfernung der Zona pellucida freigelegt wird), die Inkorporation in das Ooplasma und die Dekondensation des Spermatozoenkerns. Obwohl beim "Hamstertest" Korrelationen mit der Spermatozoenmotilität bestehen, sind Beweglichkeit und Befruchtungskapazität menschlicher Spermatozoen zwei voneinander unabhängige Phänomene, die isoliert gestört sein können (Aitken 1983).

Von großer Bedeutung für die Spermatozoenfunktion ist außerdem die Fähigkeit der Spermatozoen zur Wanderung durch den weiblichen Genitaltrakt. Der Zervixmukus-Penetrations-Test (Kremer 1965; Katz et al. 1980) erlaubt eine quantitative Beurteilung der Spermatozoenwanderung durch den Mukus.

Eine direkte Untersuchung der Fähigkeit menschlicher Spermatozoen, den Ort der Befruchtung in vivo zu erreichen, ist mit Hilfe einer laparaskopischen Spermatozoengewinnungstechnik möglich (Spermatozoenaszensionstest). Dabei werden einige Zeit nach natürlicher oder künstlicher Besamung laparaskopisch die Eileiterfimbrien gespült, Peritonealflüssigkeit abgesaugt und die Proben anschließend auf Spermatozoen untersucht (Koch et al. 1974; Templeton und Mortimer 1980).

Trotz dieser Fortschritte sind die diagnostischen Möglichkeiten zur Erfassung der tatsächlichen Gründe einer Infertilität noch sehr begrenzt. So besteht z.Zt. beispielsweise keine Möglichkeit, kritische biologische Vorgänge wie Eiaufnahme, Embryotransport und Einnistung zu beurteilen, obwohl auch sie als Quellen menschlicher Infertilität in Frage kommen (Aitken 1983).

Die zur Verfügung stehenden routinemäßig angewandten Beurteilungskriterien der Spermatozoenfunktion sind wenig aussagefähig und die genannten neueren funktionellen Untersuchungsverfahren relativ aufwendig. Daher wäre die Einführung einer einfachen und zugleich hinsichtlich der Befruchtungsfähigkeit aussagekräftigen Untersuchungsmethode für menschliche Spermatozoen ein großer Fortschritt für die andrologische Routine. Die "Triple-stain-Technik", mit der zumindest ein wichtiger Aspekt der Befruchtungskapazität, nämlich die Akrosomreaktion, erfaßt wird, ist möglicherweise ein erster Schritt in diese Richtung, da sie mit einfachen Mitteln und einem erträglichen Zeitaufwand durchführbar ist.

2.4.2 Befruchtungsfähigkeit der Spermatozoen bei verschiedenen andrologischen Krankheitsbildern

2.4.2.1 Oligozoospermie

Von Oligozoospermie spricht man, wenn Männer im Ejakulat regelmäßig weniger als 20 Millionen Spermatozoen pro ml aufweisen.

Im Vergleich zu normal fertilen Männern zeigen Patienten mit Oligozoospermie eine gravierende Verminderung der Befruchtungsfähigkeit ihrer Spermatozoen. Bei 70% der Oligozoospermie-Patienten konnte im "Hamstertest" keine Fertilisationskapazität nachgewiesen werden (0% Penetration). Diese Männer sind also sicher infertil. Bei den restlichen 30% gelang es zumindest einigen Spermatozoen, eine Eizelle zu befruchten (Aitken et al. 1983).

Die Fertilitätsstörung bei Oligozoospermie dürfte also weniger eine direkte Folge der niedrigen Spermatozoenzahl, sondern vielmehr ein Ausdruck der gestörten Befruchtungsfähigkeit der Spermatozoen sein. Sowohl die niedrige Spermatozoenzahl als auch die gestörte Befruchtungsfähigkeit sind vermutlich Folge einer fundamentalen Störung der Spermiogenese (Aitken et al. 1983).

Kürzlich untersuchten Reyes und Mitarbeiter (1984) mit Hilfe der von Talbot und Chacon (1981) angegebenen "Triple-stain"-Technik die Akrosomreaktion bei Patienten mit Oligozoospermie. Dabei zeigte sich, daß bei Männern mit Oligozoospermie der Prozentsatz der akrosomen-reagierten Spermatozoen weit niedriger lag als bei einer fertilen Vergleichsgruppe. Während bei der fertilen Vergleichsgruppe der Prozentsatz der akrosomen-reagierten Spermatozoen im Laufe der Inkubation deutlich zunahm, war dieser Anstieg bei den Oligozoospermie-Patienten nicht signifikant (Reyes et al. 1984).

Diese Ergebnisse zeigen, daß Patienten mit Oligozoospermie Spermatozoen mit einer stark eingeschränkten Befruchtungsfähigkeit aufweisen, die möglicherweise auf einem Defekt während der Spermiogenese beruht.

2.4.2.2 Idiopathische Infertilität

Wenn trotz normalem Befund im Spermiogramm eine erwünschte Schwangerschaft nicht eintritt und sich bei keinem der Partner in der Anamnese oder bei der körperlichen Untersuchung ein Hinweis auf eine andere somatische Ursache der Unfruchtbarkeit ergibt, muß eine unerklärte oder idiopathische Infertilität angenommen werden.

Auch bei dieser Patientengruppe wurde der "Hamstertest" zur Beurteilung der Spermatozoenfunktion angewendet. Bei 34% der Patienten wurde eine subnormale Befruchtungsfähigkeit (1% - 10% Penetration) gefunden, jedoch im Gegensatz zur Oligozoospermie sehr wenige Fälle mit völliger Befruchtungsunfähigkeit (0% Penetration). Statt von Infertilität (wie bei der Oligozoospermie) sollte man hier also eher von Subfertilität sprechen (Aitken et al. 1983).

Mit Hilfe des Spermatozoenaszensionstests zeigten sich bei diesen Patienten Defekte in der Fähigkeit den Ort der Befruchtung zu erreichen (Templeton und Mortimer 1982).

Die Patienten mit idiopathischer Infertilität weisen somit eine eingeschränkte Fertilisationskapazität und eine Störung der Spermatozoenwanderung im weiblichen Genitaltrakt auf.

2.4.2.3 Polyzoospermie

Eine Polyzoospermie liegt vor, wenn wiederholte Untersuchungen des Ejakulats eine Spermatozoendichte von mehr als 250 Mill./ml bzw. eine Gesamtspermatozoenzahl von mehr als 800 Mill./Ejakulat ergeben.

Trotz der enormen Spermatozoendichte ist klinisch bei diesen Patienten eine stark verminderte Fertilität zu beobachten, über deren Ursachen bisher wenig bekannt ist. Möglicherweise ist die Subfertilität Folge eine Funktionsstörung der Spermatozoen. Kürzlich durchgeführte Untersuchungen weisen auf einen akrosomalen Defekt bei Polyzoospermie hin. Im Vergleich zu einer Kontrollgruppe mit Normozoospermie wurde bei Patienten mit Polyzoospermie eine beachtliche Abnahme der Akrosinaktivität (- 59%) beobachtet (Schill und Feifel 1984).

Dieser Hinweis auf ein möglicherweise defektes Akrosom veranlaßte uns, die Akrosomreaktion bei Polyzoospermie-Patienten im Vergleich zu einem Normalkollektiv zu untersuchen. Dabei zeigte sich, daß Spermatozoen von Männern mit Polyzoospermie in vitro keine Akrosomreaktion eingehen. Die Unfähigkeit der Spermatozoen, die Hüllen der Eizelle zu penetrieren, könnte also eine Ursache der verminderten Fertilität bei dieser Gruppe sein.

3. EIGENE EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Patientengut

Für die Polyzoospermie-Gruppe wurden 19 Patienten ausgewählt, die im Spermiogramm während einer Beobachtungszeit von 2 - 4 Jahren konstant eine Spermatozoendichte von mehr als 250 Mill./ml aufgewiesen hatten (Spermatozoendichte: 396 ± 165 Mill./ml; pathologische Spermatozoen: $43 \pm 7,2$ %; motile Spermatozoen: $35 \pm 9,2$ %; progressiv motile Spermatozoen: $19 \pm 7,3$ %). Diese Männer waren trotz Kinderwunsch unfähig gewesen, ein Kind zu zeugen.

Zur Gruppe der Fertilen zählten 7 Männer, die innerhalb der letzten 6 Monate Vater eines Kindes geworden sind (Spermatozoendichte: 67 ± 58 Mill./ml; pathologische Spermatozoen: 48 ± 13 %; motile Spermatozoen: $44 \pm 8,5$ %; progressiv motile Spermatozoen: $16 \pm 8,8$ %). Zum Teil handelt es sich hier um ehemalige Patienten unserer andrologischen Ambulanz. Einige von ihnen wiesen im Spermiogramm abnorme Parameter auf.

Bei der Normozoospermie-Gruppe handelt es sich um 14 Männer, die wegen unerfülltem Kinderwunsch in die andrologische Sprechstunde kamen und bei der Untersuchung des Ejakulats mehrfach ein völlig normales Spermiogramm aufwiesen. Als Normwerte galten dabei (Mittelwerte und Standardabweichungen in Klammern): Spermatozoendichte 20 - 250 Mill/ml (112 ± 72 Mill./ml); mind. 60 % motile Spermatozoen ($54 \pm 6,4$ %); mind. 40 % progressiv motile Spermatozoen (32 ± 10 %); weniger als 50 % pathologische Spermatozoen ($37 \pm 6,8$ %).

Außerdem wurden 9 Patienten aus der andrologischen Ambulanz untersucht, die in einem oder mehreren Spermaparametern von diesen Normwerten abwichen (Oligozoospermie, Teratozoospermie, Asthenozoospermie). Diese werden hier nur exemplarisch diskutiert, da wegen der Unterschiedlichkeit der Abnormitäten im Spermogramm keine ausreichend großen Gruppen gebildet werden konnten.

3.2 Spermaanalse

Die Ejakulate dieser Patienten wurden nach einer sexuellen Karenzzeit von 6 bis 7 Tagen analysiert. Bei der Polyzoospermie-Gruppe wurden zusätzliche Samen-Untersuchungen nach eintägiger sexueller Karenz durchgeführt. Die Samenanalyse erfolgte nach den von Schirren (1982) angegebenen Kriterien.

3.3 Verwendete Lösungen

1. TMPA-Medium (Barros et al. 1978):
Natriumchlorid 137 mM, Kaliumchlorid 2,7 mM,
Natriumhydrogenkarbonat 35,7 mM,
Calciumchlorid 1,8 mM, Magnesiumchlorid 1,04 mM,
Natriumpyruvat 0,33 mM, Glucose 5 mM,
pH 7,4 - 7,8
2. TMPA-BSA-Medium: TMPA-Medium +
+ 3 mg/ml bovines Serumalbumin (BSA)
3. TMPA-HSA-Medium: TMPA-Medium +
+ 35 mg/ml humanes Serumalbumin (HSA)
4. Trypanblau: 2 %iges Trypanblau in
TMPA-HSA-Medium

5. Glutaraldehyd: 3 %iges Glutaraldehyd
in TMPA-BSA-Medium (pH 7,4)
6. Bismarkbraun: 0,8 %iges Bismarkbraun
(Fa. Sigma München) in deionisiertem Wasser (pH 1,8)
7. Bengalrosa: 0,8 %iges Bengalrosa
(Fa. Sigma München) in 0,1 M Tris-Puffer (pH 5,3)

Beim Bengalrosa und Bismarkbraun ist durch vorsichtige Titration mit 2 N HCL der pH genau einzustellen (Färbung ist pH-abhängig). Für die Inkubationsmedien wurde HSA verwendet, für die Waschvorgänge das wesentlich kostengünstigere BSA.

3.4 Induktion der Akrosomreaktion und der Hyperaktivtion

Die Ejakulate wurden in der Klinik durch Masturbation gewonnen und zunächst zur Verflüssigung bei 34°C stehen gelassen. Eine Stunde nach Ejakulation wurde durch zweimaliges Waschen mit TMPA-BSA-Medium das Seminalplasma entfernt. Nach Zentrifugation (500 g; 10 min.) wurde dabei jeweils der Überstand abgesaugt und das Pellet resuspendiert.

Zur Resuspension nach dem zweiten Waschvorgang wurde TMPA-HSA-Medium (Kapazitationsmedium) verwendet und die Spermatozoendichte auf einen Bereich zwischen 50 und 100 Mill./ml eingestellt. Nun wurden 4 Portionen à 0,2 ml in 0,5 ml-Plastiktübchen abgefüllt und drei von diesen für 1, 3 bzw. 6 Stunden in einer Atmosphäre von 5% CO₂ in Luft bei 37° C inkubiert; der 0-Stunden-Wert dagegen wurde sofort untersucht. Die Proben wurden zum jeweiligen Zeitpunkt, also nach 0, 1, 3 und 6 Stunden auf Akrosomreaktion und Motilitätseigenschaften untersucht.

3.5 Beurteilung der Akrosomreaktion mittels der "Triple-stain"-Technik

3.5.1 Methode

Die Akrosomreaktion kann mittels der von Talbot und Chacon (1981) beschriebenen "Triple-stain"-Technik direkt beurteilt werden.

Die Färbung erfolgt in zwei Schritten:

1. Mit Hilfe des Supravital-Farbstoffes Trypanblau, der nur in tote Zellen eindringt, werden zunächst lebende und tote Spermatozoen von einander unterschieden.
2. Eine weitere Differenzierung erfolgt durch Färbung der fixierten Spermatozoen mit Bismarckbraun und Bengalrosa, wobei sich durch Bismarckbraun die postakrosomale Region und durch Bengalrosa das (unreagierte) Akrosom markieren läßt.

zu 1 Zu den Proben wurden je 200 µl Trypanblaulösung zugegeben und die Färbelösung für 15 min bei 37°C inkubiert. Es folgten zwei Waschvorgänge, wobei die Plastikgefäße mit TMPA-BSA-Medium aufgefüllt, zentrifugiert (500 g; 6 min) und der Überstand abpipettiert wurde. Die gefärbten Spermatozoen wurden nun nach Zugabe von 1 ml Glutaraldehydlösung für weitere 30 min bei 37°C inkubiert (Fixierbad). Es folgten nun zwei Waschvorgänge mit deionisiertem Wasser. Die fixierten Spermatozoen wurden auf einem Objektträger aufgetragen, ausgestrichen und an der Luft getrocknet.

zu 2 Der weitere Färbevorgang konnte nach Belieben innerhalb der nächsten Tage durchgeführt werden. Die Objektträger wurden zunächst für 5 min bei 37 ° C in Bismarkbraun-Lösung inkubiert. Nach gründlichem Waschen in deionisierten Wasser erfolgte die Färbung mit Bengalrosa bei Raumtemperatur (25 - 30 min). Anschließend wurden die Objektträger erneut gründlich gewaschen, in aufsteigender Alkoholreihe getrocknet, in Xylol gereinigt und mit einem Deckglas bedeckt.

3.5.2 Auswertung

Die Auswertung erfolgte bei 1000-facher Vergrößerung mit einem Phasenkontrast-Mikroskop. Die Mikroskopausschnitte wurden durch Zufall ausgewählt und in jedem Ausschnitt alle Spermatozoen ausgewertet, bis eine Gesamtzahl von 400 morphologisch intakten Spermatozoen erreicht war.

Die morphologisch intakten Spermatozoen wurden in drei Kategorien unterteilt (Abb. 4):

1. lebendige, nicht akrosomen-reagierte Spermatozoen:
Sie sind trypanblau-negativ, d.h. im postakrosomalen Abschnitt hellbraun (Bismarkbraun), und am Akrosom kräftig rosa gefärbt (Bengalrosa).
2. lebendige, akrosomen-reagierte Spermatozoen:
Sie sind trypanblau-negativ, also ebenfalls im postakrosomalen Abschnitt hellbraun, am Akrosom jedoch weiß (bis blaßrosa) gefärbt. Zu dieser Gruppe wurden auch Spermatozoen gezählt, die noch keinen kompletten Akrosomenverlust aufwiesen (Weißfärbung), aber bereits eine ausgeprägte Vesikulation am Akrosom zeigten, die ja ebenfalls auf eine ablaufende Akrosomreaktion hinweist.

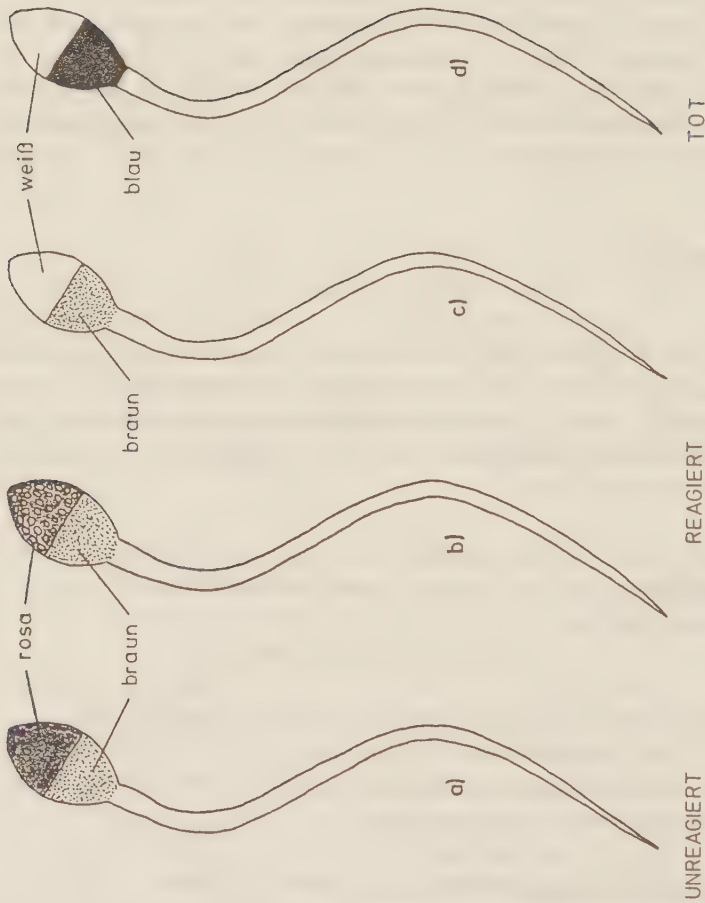


Abb. 4: Beurteilung der Akrosomreaktion mit Hilfe der Triple-stain-Technik. Die Bilder a) - c) zeigen lebendige Spermatozoen, davon sind a) unreaktiert, b) und c) reagiert. Bild d) zeigt ein totes Spermatozoon. Intakte (unreaktierte) Akrosomen sind rosa, Reagierende Akrosomen weisen entweder eine deutliche Vesikulation auf oder sind ganz weiß (Akrosomenverlust). Lebendige Spermatozoen sind am postakrosomalen Abschnitt braun gefärbt, tote Spermatozoen dunkelblau bis schwarz.

3. tote Spermatozoen:

Sie sind trypanblau-positiv, d.h. am postakrosomalen Abschnitt und z.T. auch am Akrosom tiefblau bis schwarz gefärbt.

3.5.3 Anmerkungen zur Methode

Die triple-stain-Methode erlaubt eine gute Beurteilung des akrosomalen Zustandes der untersuchten Spermatozoen. Struktur und Färbung sind gut erkennbar. Zwischen den rosagefärbten, unreaktierten und weißen, reaktierten Spermatozoen gibt es fließende Übergänge. Hier war eine eindeutige Zuordnung manchmal etwas schwierig, mit einiger Übung jedoch durchaus möglich.

Von großer Bedeutung bei der Durchführung der Versuche war die kontinuierliche Aufrechterhaltung eines konstanten pH. Der pH wurde während der Versuche laufend gemessen und lag beständig im Bereich von 7,4 bis 7,8.

Der Einfluß des pH auf die Akrosomreaktion wurde zu Beginn der Versuchsreihe genau untersucht. Dabei zeigte sich eine deutliche Zunahme der Anzahl reagierter Spermatozoen bei alkalischem pH (7,8 bis 8,5). Diese Beobachtung steht im Einklang mit früheren Arbeiten über die pH-Abhängigkeit der Akrosomreaktion (Bedford 1983).

Aus diesem Grund war es von größter Bedeutung, den pH während der Versuche konstant zu halten. Wenn das TMPA-Medium längere Zeit an der Raumluft steht, gibt wegen der niedrigen CO_2 -Konzentration der Umgebungsluft der Bikarbonatpuffer des Mediums laufend CO_2 ab, bis der CO_2 -Gradient zwischen Medium und Raumluft ausgeglichen ist. Dadurch steigt der pH auf alkalische Werte

(bis ca. 8,5) an. Um den pH ständig im Bereich von 7,4 bis 7,8 zu halten, war es nötig, sowohl das Waschmedium (TMPA-BSA) als auch das Inkubationsmedium (TMPA-HSA) ständig in einer Atmosphäre von 5% CO₂ in Luft (bei 37°C) zu inkubieren. Da die Medien einige Zeit brauchten, bis sie im pH-Normbereich lagen, war vor Versuchsbeginn eine Vorinkubation über Nacht erforderlich. Um ein Bakterienwachstum in den Lösungen zu verhindern, wurden sie vor der Inkubation steril filtriert.

3.6 Beurteilung der Motilität mittels der Dunkelfeldmethode

3.6.1 Methode

Bei der Untersuchung der Motilitätseigenschaften wurde besonderen Wert auf die Beurteilung der "Whiplash"-Bewegung gelegt. Zu diesem Zweck wurde die mikrophotographische Dunkelfeldmethode nach Overstreet et al. (1979) so modifiziert, daß einerseits durch eine geringere Vergrößerung weit mehr Spermatozoen pro Fotografie abgebildet wurden und somit eine größere Anzahl von Spermatozoen ausgewertet werden konnte, andererseits trotzdem die typische "Whiplash"-Bewegung deutlich erkennbar blieb und die Breite des "lateral head displacement" exakt ausgemessen werden konnte.

Als Beobachtungskammer wurde die von Makler eingeführte und vertriebene sog. Maklerkammer verwendet, die durch ein eingraviertes Netz von 10 x 10 Rechtecken von je 0,1 x 0,1 mm Größe einen direkten Größenvergleich für das Ausmessen der Spermatozoenbahnen erlaubt (Makler 1978 b). Die Dicke der Kammer beträgt 10 µm. Die Vergrößerung des Mikroskopes entsprach ebenfalls der von Makler vorgeschlagenen Methode (Objektiv 10x, die Kamera war ohne zwischengeschaltete Linse auf dem Mikroskop angebracht).

Zum Zeitpunkt 0, 1, 3 und 6 Stunden wurden von der jeweiligen Probe 5 μ l abgenommen, auf die Maklerkammer aufgetragen und mit dem Deckglas abgedeckt. Mit Hilfe eines Thermostaten wurde die Temperatur der Beobachtungskammer konstant bei 37°C gehalten. In die auf dem Mikroskop befindliche Kamera war zuvor ein Schwarz-Weiß-Film (Ilford FP4, 125 ASA) eingelegt worden. Von jeder Probe wurden bei einer Belichtungszeit von 1 sec zwei Aufnahmen von verschiedenen Kammerausschnitten gemacht. Auf diese Weise wurden die Wege, die die motilen Spermatozoen innerhalb von 1 sec. zurücklegten, photographisch festgehalten (Abb. 5). Die unbeweglichen Spermatozoen wurden dabei als kleine, kreisförmige Punkte abgebildet; ihr Schwanz war nicht immer deutlich erkennbar. Die ortbeweglichen Spermatozoen stellten sich als etwas größere, unscharfe Kreise dar.

Nach Entwicklung der Filme wurden die Negative gerahmt. Mit Hilfe eines eigens dafür entwickelten Gerätes wurden die Bilder anschließend ausgewertet. Das Prinzip dieses Gerätes ist sehr einfach: Mit Hilfe eines Spiegels wird der Lichtstrahl eines Diaprojektor reflektiert und auf einem 44 x 28 cm großen Projektionschirm abgebildet. Dadurch kam es zu einem weiteren Vergrößerungseffekt. Bei der Auswertung der Spermatozoenbahnen entsprachen nun 5 cm auf dem Projektionsschirm einer tatsächlichen Strecke von 100 mm (= 500-fache Vergrößerung).

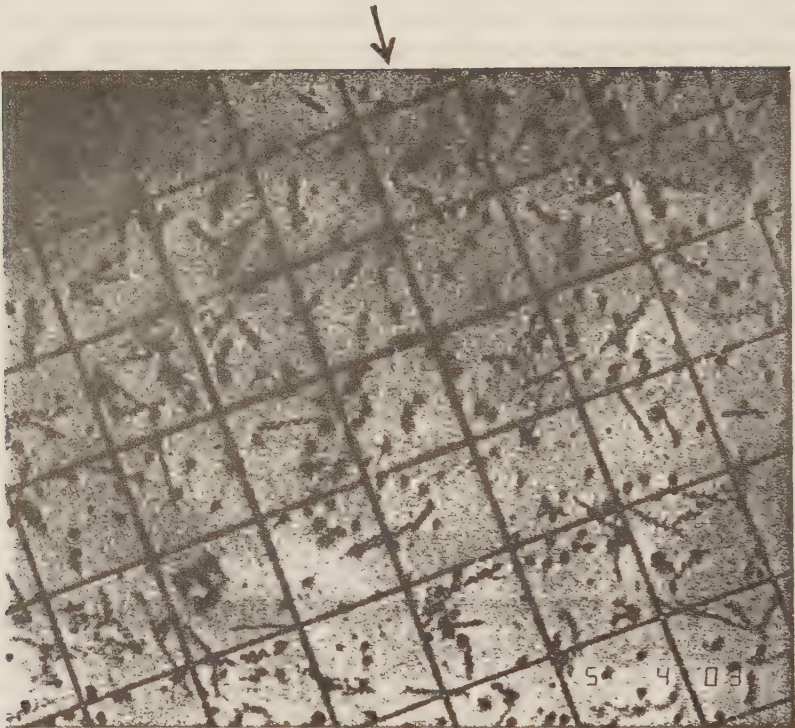


Abb. 5: Darstellung der Spermatozoenmotilität mit Hilfe einer mikrophotographischen Dunkelfeldmethode (modifiziert nach Overstreet et al. 1969). Unbewegliche Spermatozoen sind als kleine Punkte zu sehen. Die Wegstrecken, die die beweglichen Spermatozoen innerhalb von 1 sec. (= Belichtungszeit) zurücklegen, sind als lineare oder wellen- bzw. zackenförmige Striche zu erkennen, die z.T. einen geraden, z.T. einen gebogenen Verlauf aufweisen. Wellenförmige Bewegungen, deren Amplitude mehr als $10\text{ }\mu\text{m}$ beträgt, werden als "Whiplash"-Bewegung bezeichnet ($\longrightarrow$).

3.6.2 Auswertung

Bei der Auswertung der Motilität wurden folgende Parameter beurteilt:

1. Anteil der vorwärts beweglichen Spermatozoen (in % aller Spermatozoen)
2. Anteil der Spermatozoen mit "Whiplash"-Bewegung (in % der vorwärts beweglichen Spermatozoen)
3. mittlere Geschwindigkeit der vorwärts beweglichen Spermatozoen (in $\mu\text{m}/\text{sec}$)

Zu 1 Zunächst wurde die Gesamtzahl der Samenzellen ausgezählt; anschließend erfolgte die Auszählung aller eindeutig vorwärts beweglicher Spermatozoen.

Zu 2 Als "Whiplash"-Bewegung wurden diejenigen Spermatozoenbahnen gewertet, deren "lateral head displacement" mehr als $10 \mu\text{m}$ betrug (siehe Aitken et al. 1983). Nach genauem Ausmessen der Breite der einzelnen Spermatozoenbahnen wurde der prozentuale Anteil der Spermatozoen mit "Whiplash"-Bewegung bestimmt.

Zu 3 Zur Beurteilung der mittleren Geschwindigkeit wurde die Länge der einzelnen Spermatozoenbahnen ausgemessen. Hierzu diente ein gewöhnlicher, im Handel erhältlicher Entfernungsmesser für Landkarten, mit dem die einzelnen Strecken abgefahren wurden. Die Strecken aller ausgezählter Spermatozoenbahnen wurden addiert und der Mittelwert errechnet. Nach maßstabsgerechter Umrechnung erhielt man nun die durchschnittliche Wegstrecke, die ein vorwärts bewegliches Spermium pro Sekunde zurücklegte (da die Belichtungszeit ja 1 sec betrug).

Pro Foto wurden jeweils 100 Spermatozoen ausgezählt und ausgemessen. Der zeitliche Verlauf der drei Parameter (Motilität, mittlere Geschwindigkeit und "Whiplash"-Bewegung) wird aus der grafischen Darstellung der einzelnen Werte (0-, 1-, 3- und 6-Stunden-Wert) ersichtlich.

3.7 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse der Versuchsergebnisse erfolgte mit Hilfe des Student t-Tests.

4. VERSUCHSERGEBNISSE

4.1 Ergebnisse der Routinediagnostik

Vor der Untersuchung von Akrosomreaktion und "Whiplash"-Bewegung wurden alle Ejakulate zunächst nach den üblichen Kriterien andrologischer Diagnostik beurteilt. Tab. 1 zeigt die Durchschnittswerte sowie die Standardabweichungen von Spermatozoendichte, Anteil pathologischer Spermatozoen, Anteil motiler und progressiv motiler Spermatozoen bei den einzelnen Patientengruppen.

Die vergleichsweise schlechte Samenqualität bei der Gruppe fertiler Männer dürfte dadurch bedingt sein, daß es sich bei 5 der 7 Probanden um ehemalige Patienten unserer andrologischen Ambulanz handelte. Diese Beobachtung verdeutlicht außerdem die Tatsache, daß Normozoospermie keineswegs Voraussetzung für eine erfolgreiche Induktion einer Schwangerschaft ist.

Bei der Polyzoospermie fielen neben der definitionsgemäß hohen Spermatozoendichte die niedrigen Werte für motile und progressiv motile Spermatozoen auf.

4.2 Akrosomreaktion

4.2.1 Akrosomreaktion bei Männern mit erwiesener Fertilität

Die Kinetik der Akrosomreaktion zeigte bei allen untersuchten Männern mit erwiesener Fertilität innerhalb des Untersuchungszeitraums von 6 Stunden einen deutlichen Anstieg des Anteils reagierter Spermatozoen als Ausdruck einer ablaufenden Akrosomreaktion. Gewöhnlich lag das Maximum bei 3 Stunden. Nach 6 Stunden war bei einer Zunahme der toten Spermatozoen in den meisten

	Fertile (n = 7)	Normozoospermie (n = 14)	Polyzoospermie (n = 19)
Spermatozoendichte (Mill./ml)	67 ± 58	112 ± 72	396 ± 165
pathologische Spermatozoen (in %)	48 ± 13	37 ± 6,8	43 ± 7,2
motile Spermatozoen (in %)	44 ± 8,5	54 ± 6,4	35 ± 9,2
progressiv motile Spermatozoen (in %)	16 ± 8,8	32 ± 10	19 ± 7,3

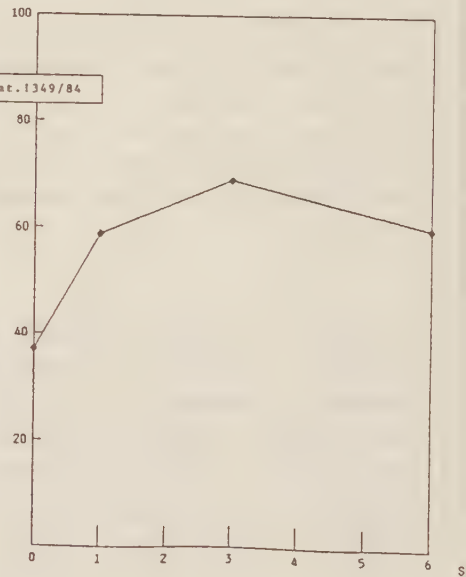
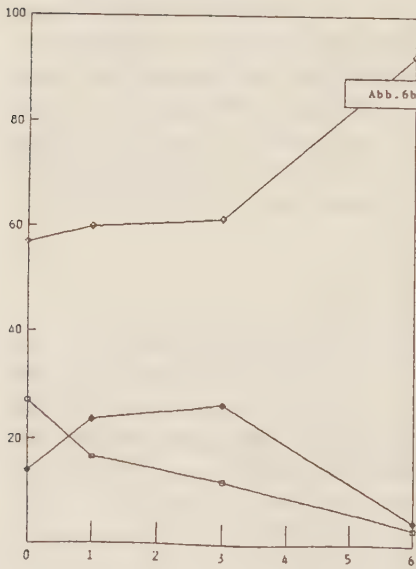
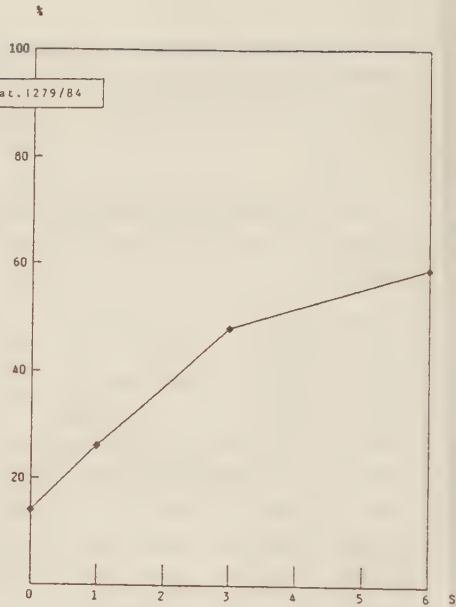
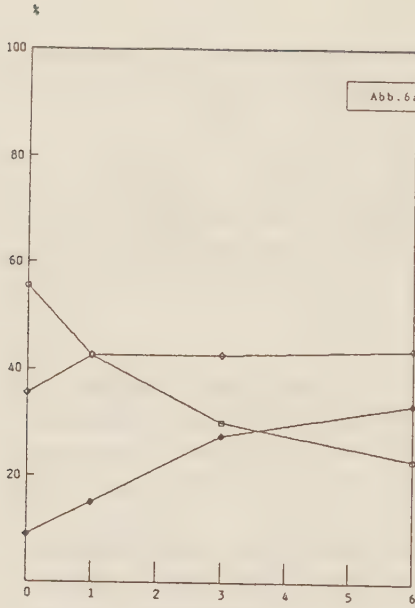
Tab. 1: Die Tabelle zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen der andrologischen Routineparameter für die einzelnen Patientengruppen.

Fällen eine Abnahme der reagierten Spermatozoen zu beobachten. Diese Beobachtung läßt auf ein zunehmendes Absterben reagierter Spermatozoen schließen.

Einige Beispiele sollen veranschaulichen, daß es deutliche individuelle Unterschiede in der Kinetik der Akrosomreaktion gibt (Abb. 6).

Ein fertiler Proband (Nr. 1279/84) zeigte beispielsweise bei einem niedrigen Ausgangswert einen kontinuierlichen Anstieg der Zahl reagierter Spermatozoen (linker Kasten, $\text{---}\blacklozenge\text{---}$). Dementsprechend nahm der Anteil unreagerter Spermatozoen ab ($\text{---}\circ\text{---}$). Die toten Spermatozoen nahmen geringfügig zu ($\text{---}\blacklozenge\text{---}$). Im linken Kasten werden die einzelnen Kurven in % aller morphologisch intakten Spermatozoen (einschließlich der toten) wiedergegeben; der rechte Kasten dagegen zeigt die reagierten Spermatozoen in % der vitalen, morphologisch intakten Spermatozoen. Durch diese Darstellungsweise, die den Anteil der toten Spermatozoen außer acht läßt, kann der Verlauf der Akrosomreaktion noch deutlicher dargestellt werden und entspricht außerdem besser der in vivo-Situation. Denn am Ort der Befruchtung ist der Anteil der reagierten an der Gesamtzahl lebendiger Spermatozoen das relevante Kriterium, da die toten Spermatozoen erst garnicht bis in den Eileiter gelangen.

Ein anderer fertiler Proband (Nr. 1349/84) wies innerhalb der ersten 3 Stunden ebenfalls einen kräftigen Anstieg bei den reagierten Spermatozoen auf. Nach 6 Stunden zeigte sich jedoch eine starke Zunahme der toten Spermatozoen. Das Absterben betraf dabei sowohl die reagierten als auch die unreagierten Spermatozoen, die beide eine deutliche Abnahme aufwiesen.



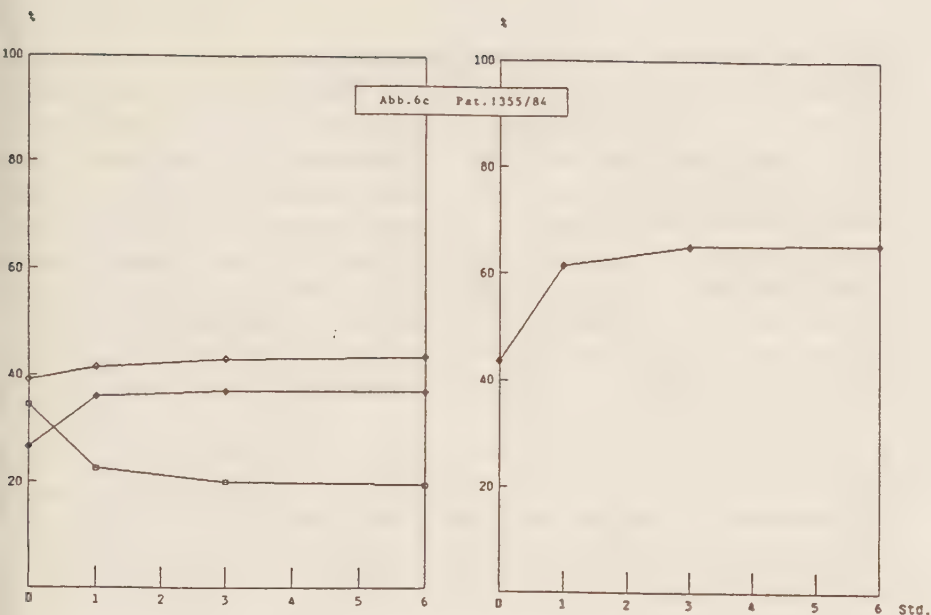


Abb. 6: Die Akrosomenreaktion bei drei Männern mit erwiesener Fertilität.

Zeichenerklärung:

- linker Kasten
 - vitale, unreaktierte Spermatozoen
 - ◆— vitale, reaktierte Spermatozoen
 - ◇— tote Spermatozoen
 - rechter Kasten
 - ◆— vitale, reaktierte Spermatozoen in % der vitalen Spermatozoen
 - x - Achse: Zeit in Stunden
 - y - Achse: Prozent
- } in % aller morphologisch intakten Spermatozoen

Weitere Erläuterungen im Text.

Anmerkung: Bei dieser und allen folgenden Abbildungen betrug die Karenzzeit der Patienten 7 Tage (außer bei Abb. 9 b).

Bei einem weiteren fertilen Mann (Nr. 1355/84) fiel auf, daß die Zunahme reagierter Spermatozoen nach 1 Stunde nahezu abgeschlossen war. Der weitere Verlauf der Akrosomreaktion war sehr konstant. Doch hier läßt der hohe Ausgangswert bei den reagierten Spermatozoen vermuten, daß die Akrosomreaktion zum größten Teil bereits in dem nicht erfaßten Zeitraum zwischen Ejakulation und "0-Stunden"-Wert abgelaufen ist. Dieser Zeitraum umfaßt eine Stunde Wartezeit vor Versuchsbeginn, mehrere Waschvorgänge und die Färbung mit Trypanblau (insgesamt 130 - 140 min). Die Möglichkeit nicht erfaßter Vorgänge vor dem 0-Stunden-Wert ist bei dieser Methode daher grundsätzlich zu beachten.

Für jeden einzelnen Wert der Kurven wurden Mittelwert und Standardabweichung errechnet. Abb. 10 a zeigt den durchschnittlichen Verlauf der Akrosomreaktion bei fertilen Männern.

4.2.2 Akrosomreaktion bei Patienten mit normalen Spermogramm

Die Akrosomreaktion bei den untersuchten Patienten mit Normozoospermie verläuft prinzipiell ähnlich wie bei der fertilen Gruppe. Als ein repräsentatives Beispiel möge der Patient 1041/84 dienen (Abb. 7). Die stärkste Zunahme der reagierten Spermatozoen lag hier zwischen dem 0- und 1-Stunden-Wert, war aber bei anderen Individuen auch zwischen dem 1- und 3-Stunden-Wert zu finden (Patient 1006/84).

Der errechnete durchschnittliche Verlauf der Reaktionskinetik bei Normozoospermie wird in Abb. 10 b wiedergegeben.

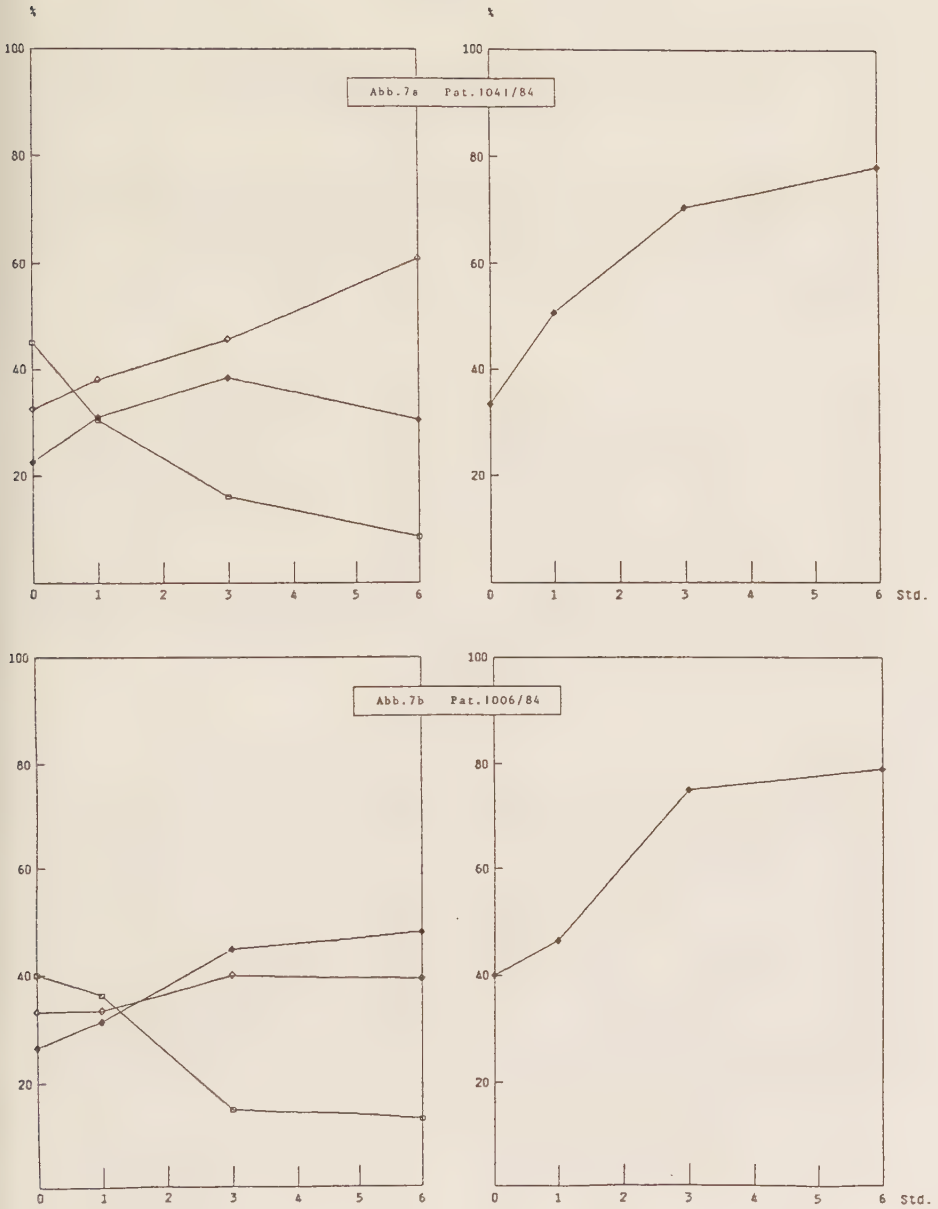


Abb. 7: Die Akrosomreaktion bei zwei Patienten mit normalem Spermogramm (Normozoospermie). Zeichenerklärung s. Abb. 6.

4.2.3 Akrosomreaktion bei Patienten mit abnormen Spermogramm

Die Akrosomreaktion wurde bei 9 Patienten mit ganz unterschiedlichen Auffälligkeiten im Spermogramm untersucht. Wegen der geringen Fallzahl erfolgte keine statistische Auswertung. Diese Versuche dienten vielmehr der exemplarischen Darstellung von Einzelfällen.

Unter drei Patienten mit Oligozoospermie zeigten zwei eine eindeutige Akrosomreaktion (Abb. 8, Pat. 1280/84) während bei einem Patienten ein Anstieg reagierter Spermatozoen nicht zu verzeichnen war (899/84). Der Anteil reagierter Spermatozoen war hier nahezu konstant (linker Kasten). Es stellt sich in diesem Fall allerdings die Frage, ob die Akrosomreaktion bereits vor dem Beobachtungszeitraum abgelaufen war. So könnte ein zu frühzeitiges Auftreten der Akrosomreaktion auch als Ursache für eine eingeschränkte Fertilität in Frage kommen.

Bei den restlichen 5 Patienten fielen subnormale Werte der Spermatozoenmotilität und der Morphologie auf. Zwei Patienten mit Asthenozoospermie und ein Patient mit Teratoasthenozoospermie wiesen eine normale Akrosomreaktion auf (z.B. Pat. 820/84). Ein Patient mit Asthenozoospermie und ein Patient mit Teratoasthenozoospermie zeigten dagegen nur eine unbedeutende Zunahme reagierter Spermatozoen (Pat. 1001/84). Möglicherweise handelt es sich hier um eine abgeschwächte bzw. gestörte Akrosomreaktion. Es muß an dieser Stelle auf die Schwierigkeit hingewiesen werden, aus diesen Kurven das Auftreten oder Fehlen einer Akrosomreaktion eindeutig zu diagnostizieren.

Abb. 8a Pat. 1280/84

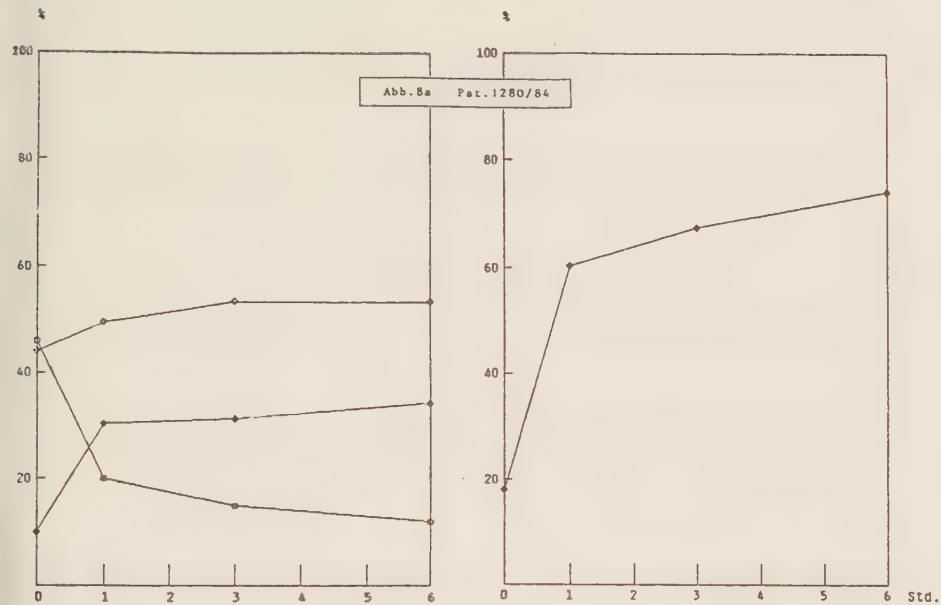
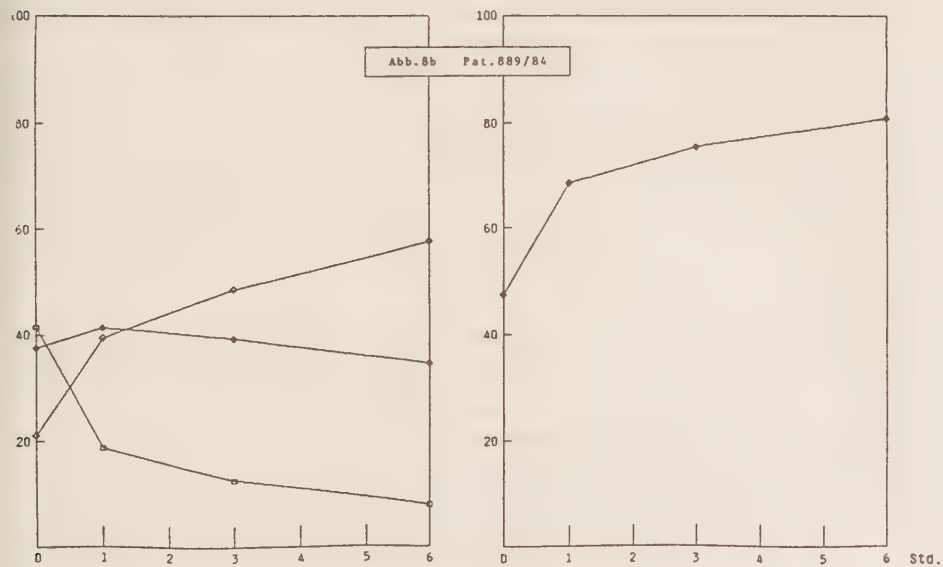


Abb. 8b Pat. 889/84



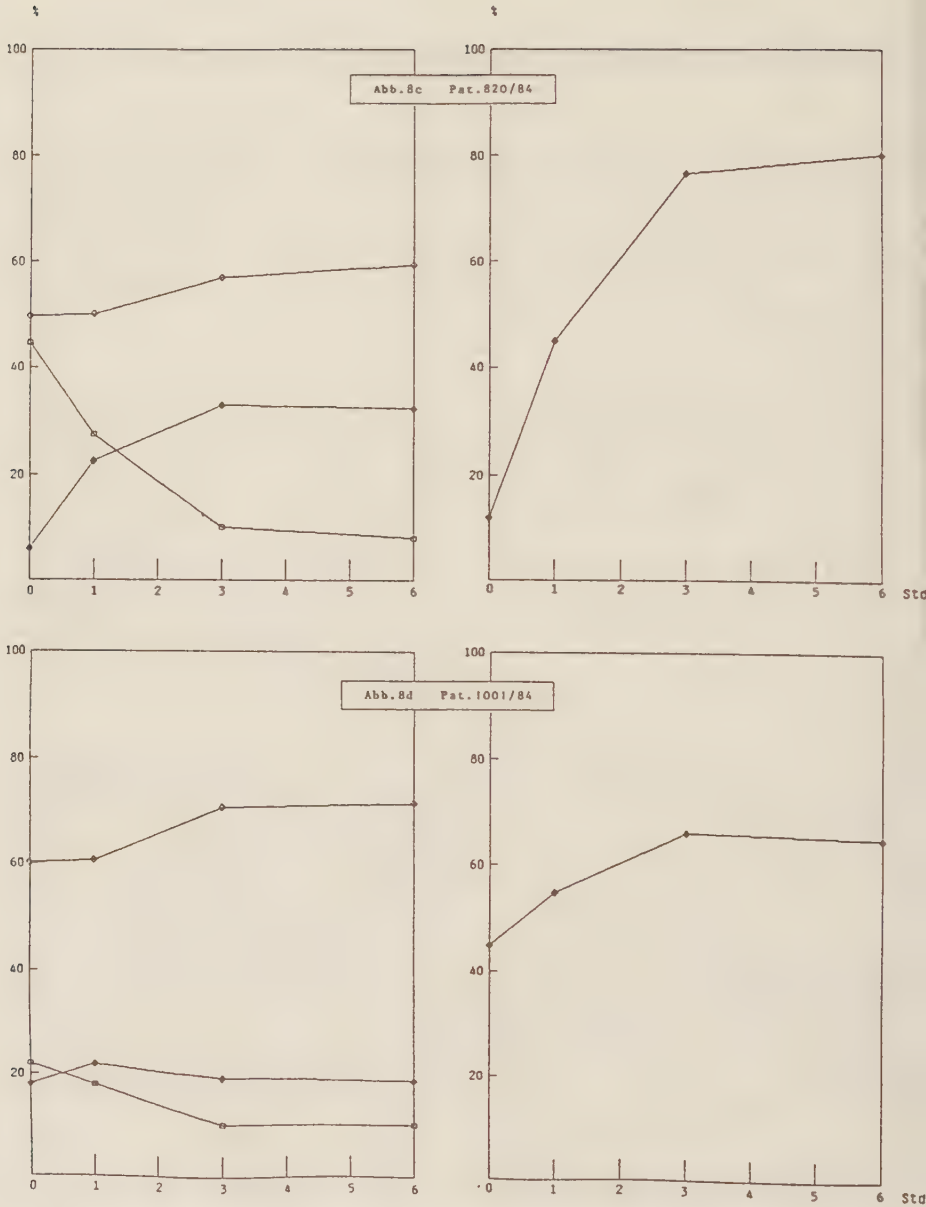


Abb. 8: Die Akrosomreaktion bei zwei Patienten mit Oligozoospermie (a, b) und bei zwei Patienten mit Asthenozoospermie (c, d). Zeichenerklärung siehe Abb. 6.

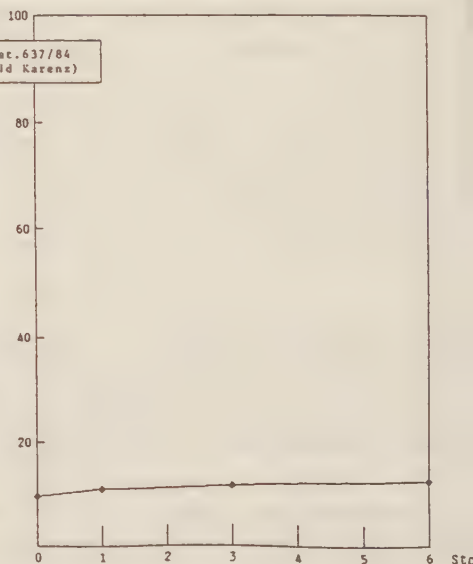
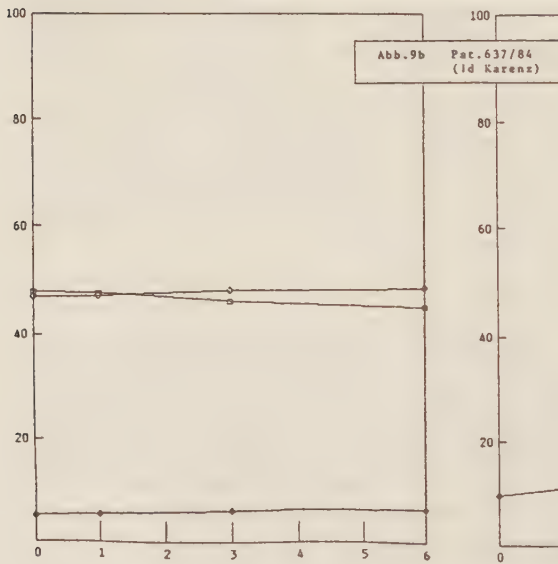
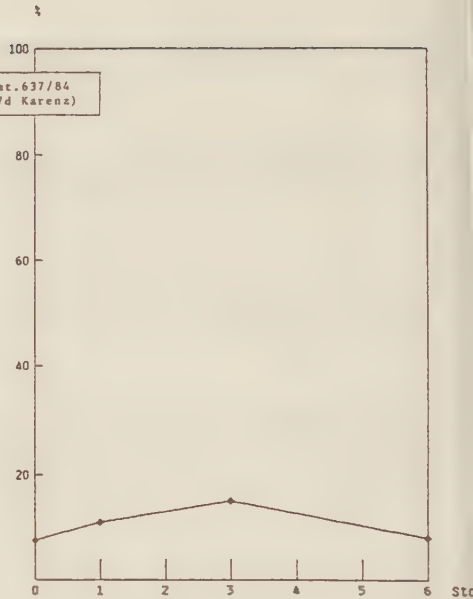
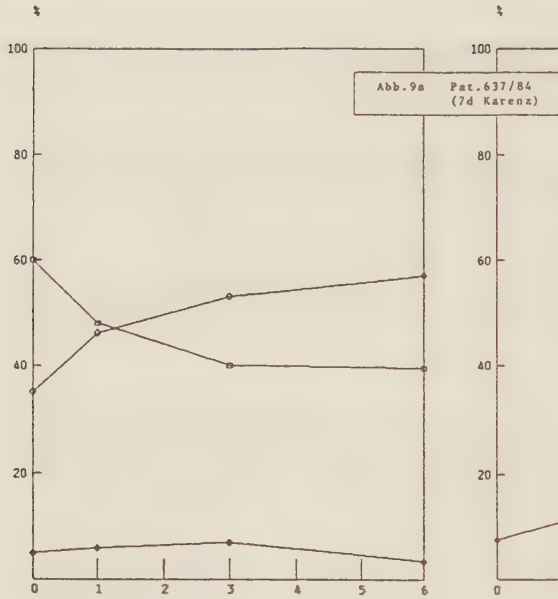
4.2.4 Akrosomreaktion bei Polyzoospermie

Es ist bemerkenswert, daß nahezu alle Patienten mit Polyzoospermie eine schwere Störung der Akrosomreaktion aufwiesen:

1. Der Anteil vitaler, akrosomen-reagierter Spermatozoen war im gesamten Beobachtungszeitraum stark erniedrigt (meist weniger als 10%).
2. Ein signifikanter Anstieg akrosomen-reagierter Spermatozoen konnte nicht beobachtet werden. In vielen Fällen kam es sogar zu einer Abnahme der Zahl akrosomen-reagierter Spermatozoen.

Patient 637/84 (Abb. 9) stellt ein typisches Beispiel für eine fehlende Reaktionskinetik bei Polyzoospermie dar. In diesem Fall waren sehr wenige akrosomen-reagierte Spermatozoen zu beobachten, die während der Inkubationszeit nur geringfügig zunahmen. Typisch ist auch Patient 639/84, bei dem eine kontinuierliche Abnahme der akrosomen-reagierten Spermatozoen auffiel. Die meisten Patienten der Polyzoospermie-Gruppe zeigten ähnliche Kurvenverläufe. Auch wenn die Ausgangswerte für den Anteil der akrosomen-reagierten Spermatozoen etwas höher lagen, konnte kein eindeutiger Anstieg beobachtet werden (Pat. 675/84).

Von Bedeutung erschien es uns auch, in der Polyzoospermie-Gruppe die Kinetik der Akrosomreaktion in Abhängigkeit von der sexuellen Karenzzeit zu untersuchen, wobei eine Karenz von 6 - 7 Tagen einer Karenz von 1 Tag gegenübergestellt wurde. Dabei zeigte sich, daß die Karenzzeit keinen Einfluß auf den Ablauf der Akrosomreaktion hat. Abb. 9 gibt für Patient 637/84 die Kurvenverläufe nach 7 Tagen bzw. 1 Tag Karenz wieder.



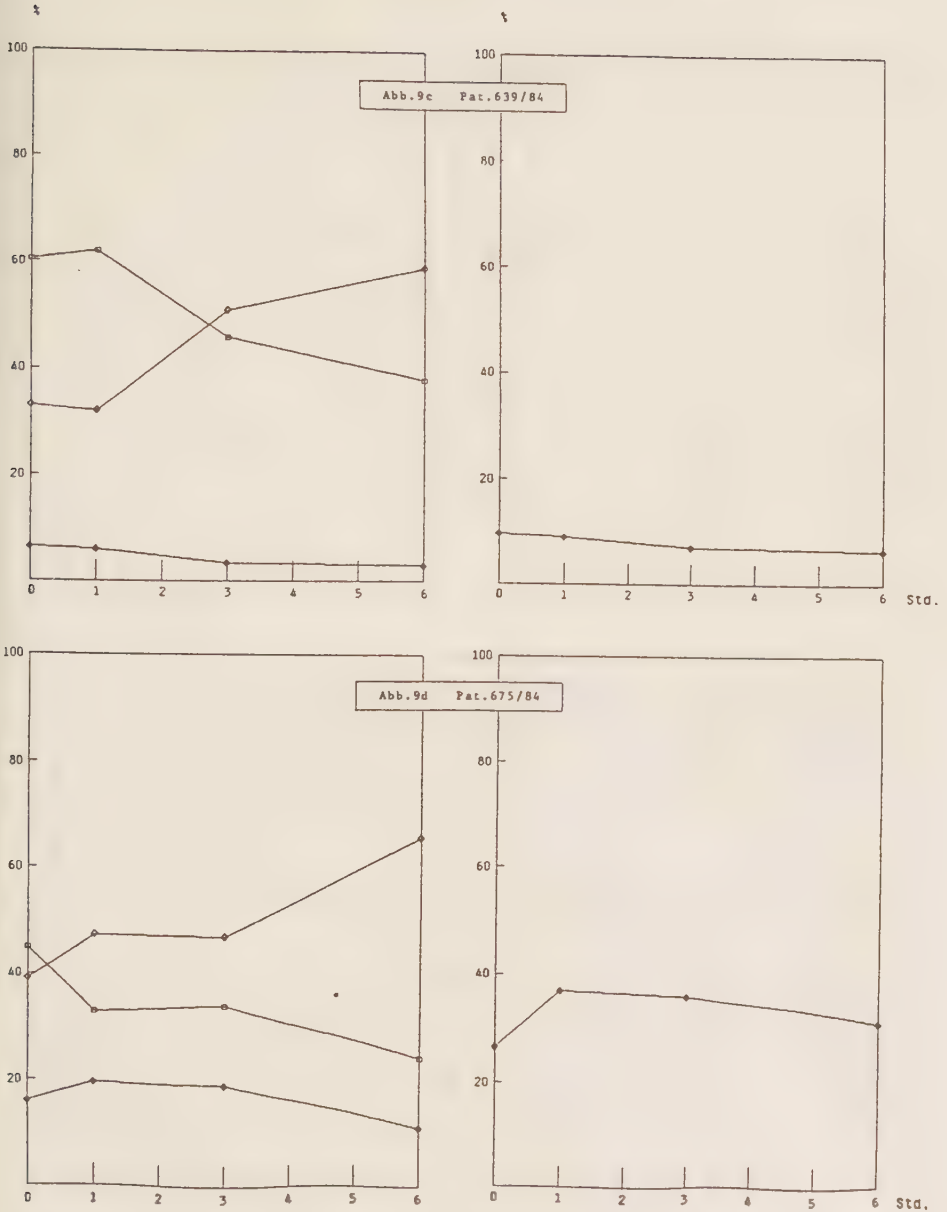
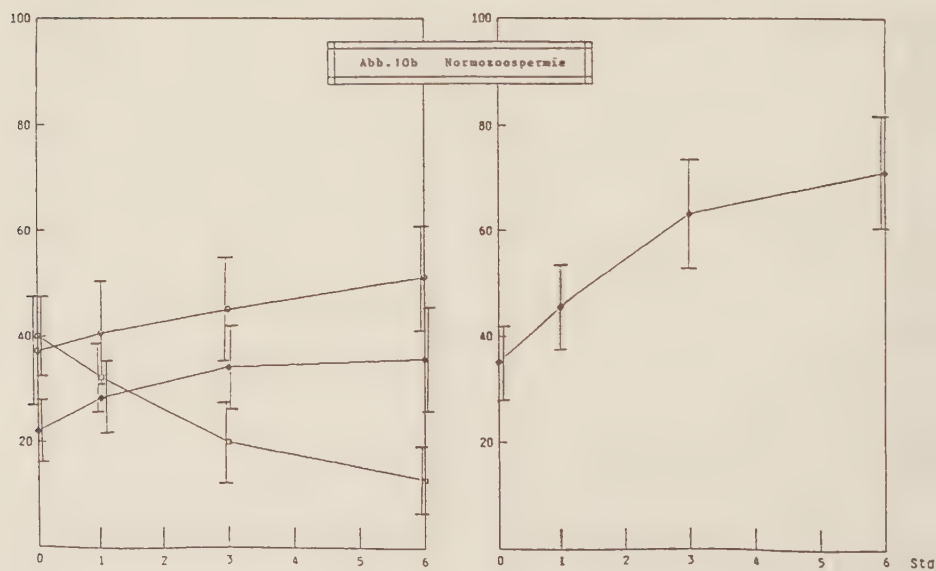
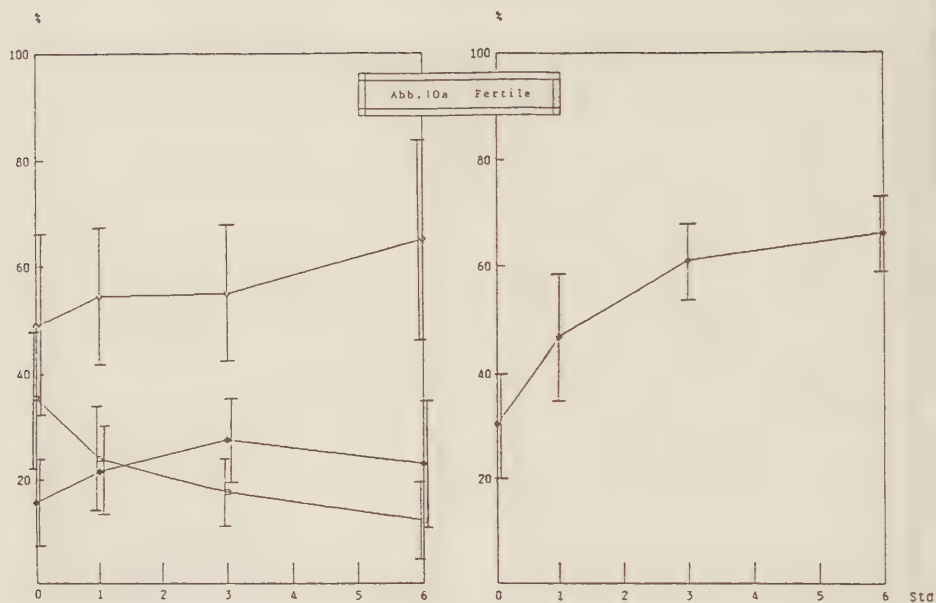


Abb. 9: Die Akrosomreaktion bei drei Patienten mit Polyzoospermie. Zeichenerklärung siehe Abb. 6.
a) Die Akrosomreaktion von Pat. 637/84 nach 7 Tagen Karenz. b) Zum Vergleich nach 1 Tag Karenz.



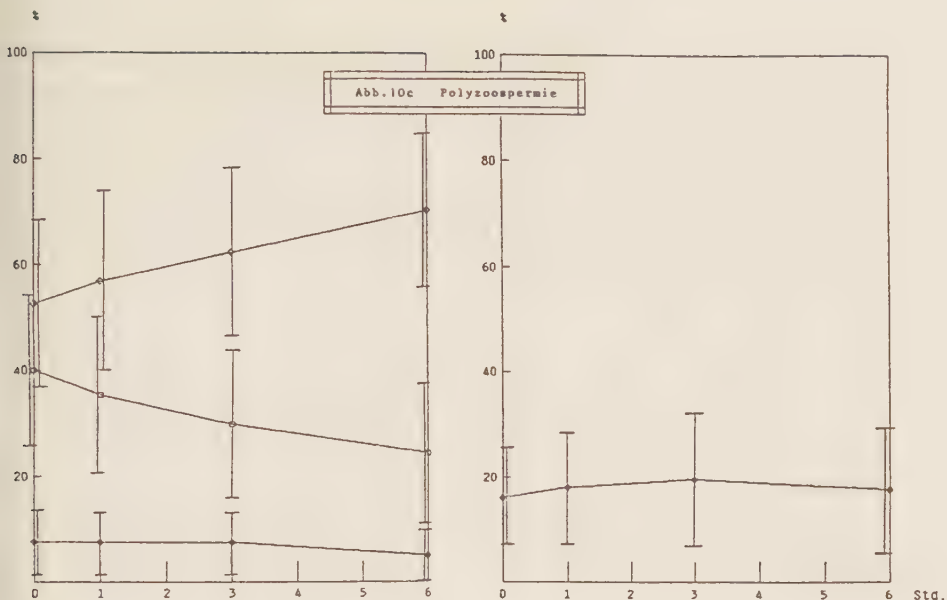


Abb. 10: Die Akrosomreaktion bei der fertilen Vergleichsgruppe (a), bei Patienten mit Normozoospermie (b) und bei Patienten mit Polyzoospermie (c). Die Kurven geben die Mittelwerte und Standardabweichungen der 0-, 1-, 3- und 6- Stundenwerte wieder. Zeichenerklärung siehe Abb. 6. Signifikanzen siehe Tab. 2.

Tab. 2: Signifikanzen des Anstiegs akrosomenreagerter Spermatozoen in Abb. 10 (p-Werte, bezogen auf den 0-Stundenwert):

	linker Kasten		rechter Kasten	
	1 Std.	3 Std.	1 Std.	3 Std.
Abb. 10 a (Fertile Männer)	0,0025	0,0005	0,0005	0,0005
Abb. 10 b (Normozoospermie)	0,0025	0,0005	0,0005	0,0005
Abb. 10 c (Polyzoospermie)	0.35(!)	Abnahme!	0,025	0,025

Abb. 10 c zeigt die statistische Auswertung sämtlicher untersuchter Polyzoospermie-Patienten ($n = 19$). Die Kurve im linken Kasten, die die reagierten Spermatozoen in % aller morphologisch intakten Spermatozoen wiedergibt, zeigt keinerlei Anstieg. Auch wenn man die reagierten Spermatozoen in Relation zur Gesamtzahl der vitalen Spermatozoen setzt (rechter Kasten), ist keine signifikante Zunahme erkennbar.

4.2.5 Vergleich der Akrosomreaktion bei fertilen Männern und Männern mit Normozoospermie und Polyzoospermie

Abb. 10 zeigt eine Gegenüberstellung der Kinetik der Akrosomreaktion bei erwiesener Fertilität, bei Normozoospermie und bei Polyzoospermie.

Die Kurven bei erwiesener Fertilität (Abb. 10 a) und normalem Spermogramm (Abb. 10 b) zeigen beide den normalen Verlauf einer Akrosomreaktion. Bei Polyzoospermie (Abb. 10 c) ist dagegen ein völliges Fehlen der Akrosomreaktion erkennbar. Die Werte für die Zahl der vitalen, akrosomen-reagierten Spermatozoen sind bei der Polyzoospermie extrem niedrig und zeigen nicht den typischen Anstieg innerhalb der ersten drei Stunden.

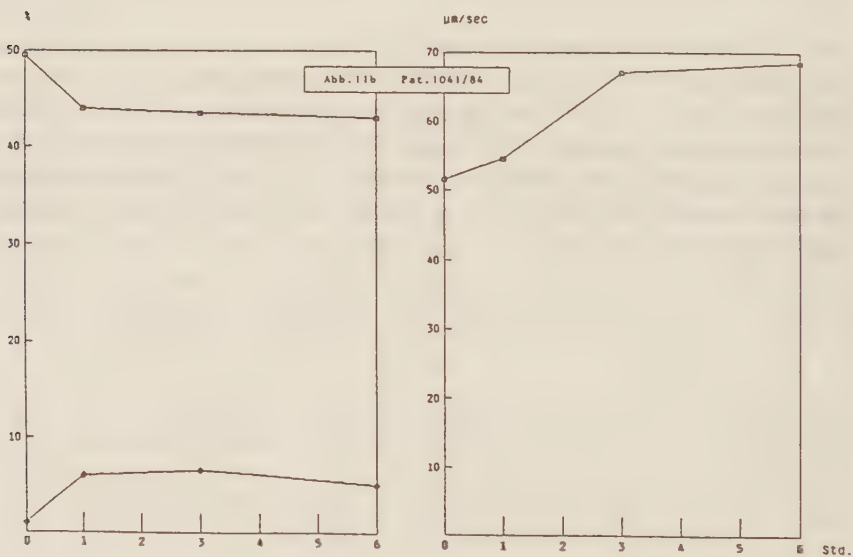
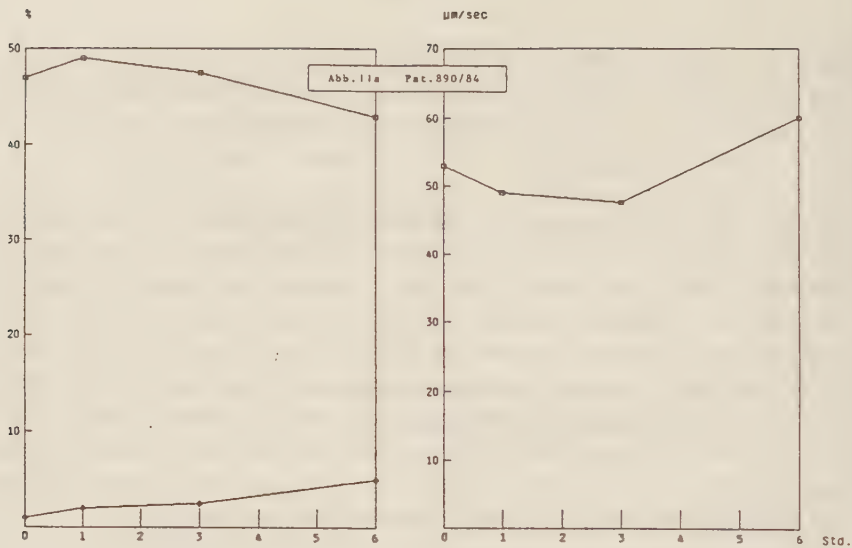
Es muß daher eine akrosomale Funktionsstörung bei den Spermatozoen von Polyzoospermie-Patienten angenommen werden.

4.3 Motilitätseigenschaften

4.3.1 Motilität bei Normozoospermie und bei fertilen Männern

In Abb. 11 sind Motilität, mittlere Geschwindigkeit und Auftreten der "Whiplash"-Bewegung bei zwei Patienten mit normalem Spermogramm sowie bei zwei fertilen Männern dargestellt. Bei den untersuchten Normozoospermie-Fällen zeigten sich innerhalb des Beobachtungszeitraums durchwegs relativ konstante Werte für Motilität und mittlere Geschwindigkeit, während der Anteil der Spermatozoen mit "Whiplash"-Bewegung zumindest innerhalb der ersten 3 - 6 Stunden stetig zunahm (z.B. Pat. 890/84 und 1041/84). Prinzipiell ähnlich verhielten sich die Motilitätseigenschaften bei den fertilen Männern (z.B. Pat. 890/84 und 1279/84).

Abb. 14 zeigt die statistischen Durchschnittswerte für die Normozoospermie-Gruppe und die Gruppe der Väter. Da es sich bei den fertilen Männern z.T. um ehemalige Patienten unserer Ambulanz mit relativ schlechten Spermogrammen handelte, lagen in dieser Gruppe die Motilitätswerte niedriger als bei Normozoospermie. Dagegen wies die "Whiplash"-Bewegung bei den fertilen Männern etwas höhere Werte auf.



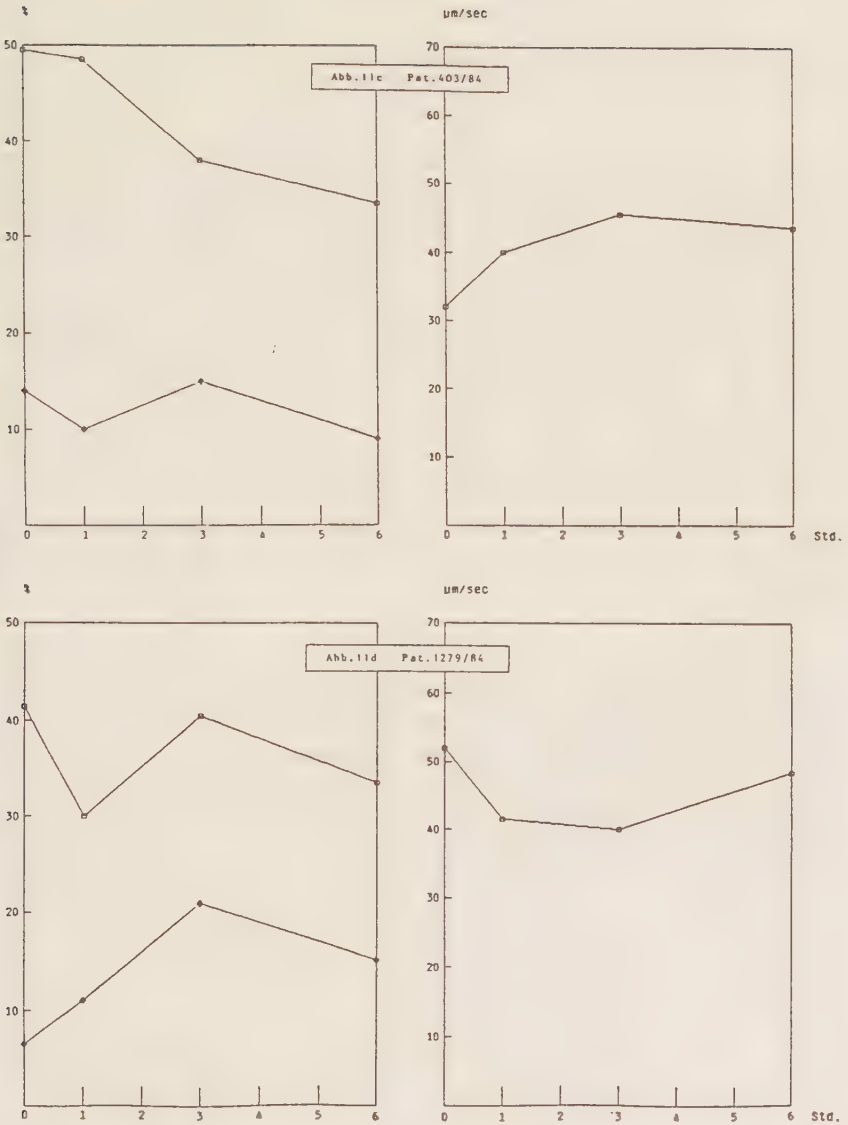
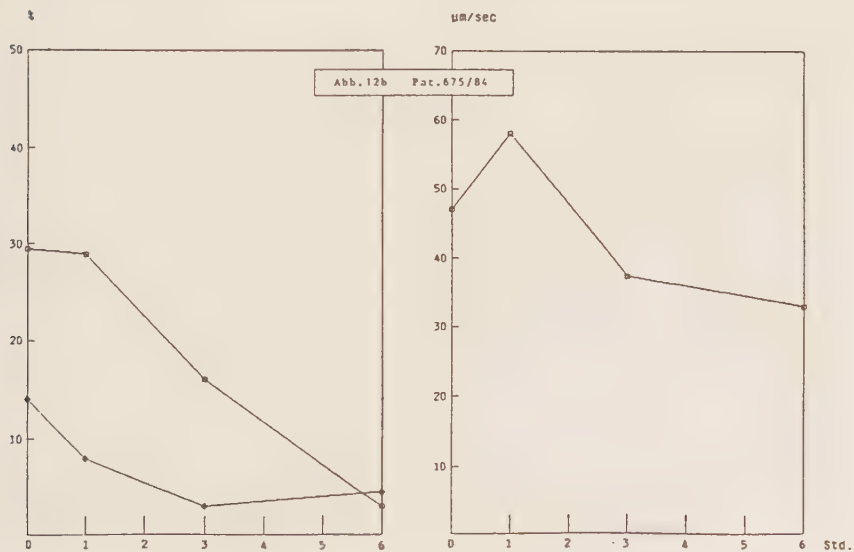
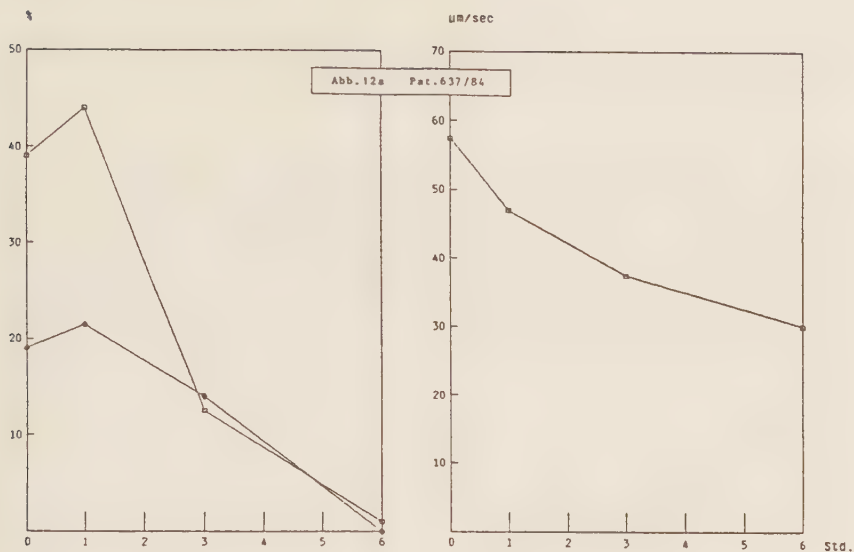


Abb. 11: Motilität, mittlere Geschwindigkeit und "Whiplash"-Bewegung bei zwei Patienten mit normalem Spermiogramm (a, b) und bei zwei fertilen Männern (c, d). Zeichenerklärung siehe Abb. 12.

4.3.2 Motilität bei Polyzoospermie

In der Polyzoospermie-Gruppe wurde bereits bei der Routine-Untersuchung eine gegenüber der Norm erniedrigte Spermatozoen-Motilität festgestellt. Auch die eigenen Untersuchungen zeigten, daß die Beweglichkeit und die mittlere Geschwindigkeit innerhalb der ersten Stunde leicht erniedrigte Werte aufwiesen. Nach 3 - 6 Stunden fiel dann ein sehr starker Rückgang der Beweglichkeit sowie ein mäßiger Rückgang der mittleren Geschwindigkeit auf (Abb. 12, Pat. 637/84, 675/84 und 677/84). Die deutliche Abnahme der Motilität war ein ziemlich konstantes Phänomen in dieser Patientengruppe. Parallel dazu fiel auch die "Whiplash"-Bewegung nach 3 - 6 Stunden stark ab. Auffallend war jedoch der hohe Anteil der "Whiplash"-Bewegung innerhalb der ersten Stunde. Abb. 14 c zeigt den durchschnittlichen Verlauf der Kurven bei Polyzoospermie.

Neben der gestörten Akrosomreaktion fällt also bei der Polyzoospermie-Gruppe eine frühzeitige Abnahme der Motilität auf. Dagegen zeigen die Befunde, daß die Spermatozoen der Polyzoospermie-Patienten fähig sind, die "Whiplash"-Bewegung (als Ausdruck der Kapazitation) einzugehen. Die Hyperaktivierung tritt sogar eher verfrüht und verstärkt auf.



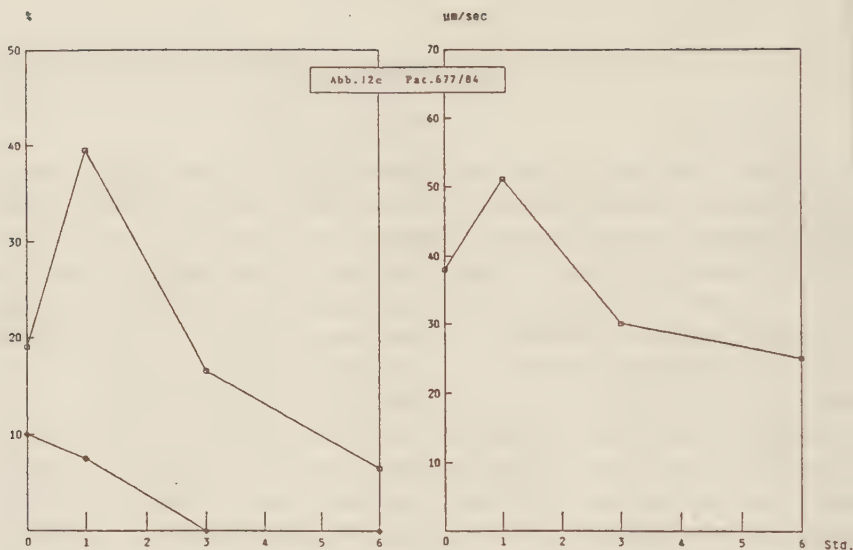


Abb. 12: Motilität, mittlere Geschwindigkeit und whiplash-Bewegung bei drei Patienten mit Polyzoospermie.

Zeichenerklärung:

- linker Kasten

- motile Spermatozoen in % aller Spermatozoen
- ◆— Spermatozoen mit whiplash-Bewegung in % der motilen Spermatozoen

- rechter Kasten

- mittlere Geschwindigkeit der motilen Spermatozoen

x - Achse: Zeit in Stunden

y - Achse: Prozent bzw. $\mu\text{m}/\text{sec}$

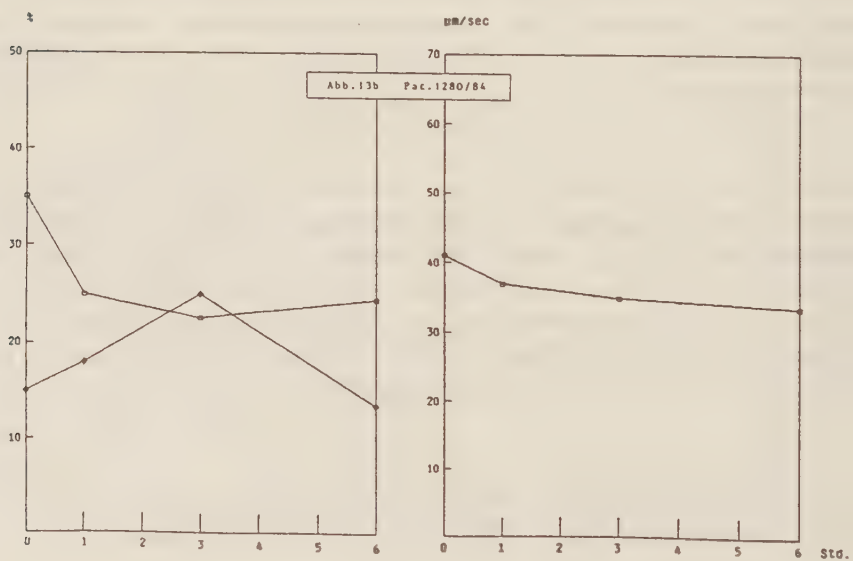
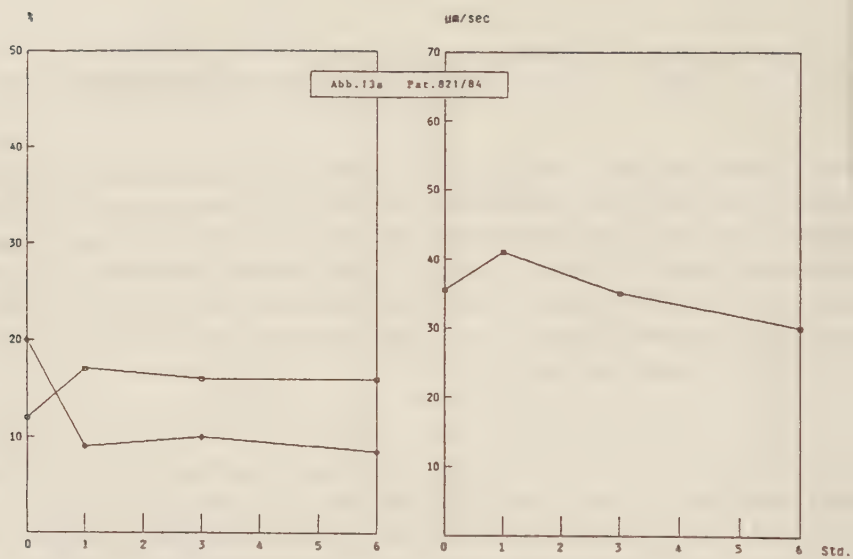
Anmerkung: Bei der Auszählung der motilen Spermatozoen wurden nur die vorwärts beweglichen Spermatozoen gewertet. Die ortsbeweglichen Spermatozoen wurden außer acht gelassen.

4.3.3 Motilität bei Patienten mit abnormen Spermiogramm

Bei Patienten mit anderen Abweichungen im Spermiogramm wurden ebenfalls die Motilitätseigenschaften der Spermatozoen bestimmt. Wegen der sehr unterschiedlichen Abweichungen im Spermiogramm konnten jedoch auch hier keine statistisch relevanten Gruppen gebildet werden. Daher soll das Verhalten von Gesamtmotilität, mittlerer Geschwindigkeit und "Whiplash"-Bewegung an einigen Beispielen erläutert werden.

Abb. 13 zeigt zwei Patienten mit dem Spermiogrammbefund einer Oligoteratozoospermie (Pat. 821/84 und 1280/84), sowie zwei Patienten, die eine Teratozoospermie aufwiesen (Pat. 823/84 und 1042/84). Bei beiden Patienten mit Oligoteratozoospermie war die Motilität innerhalb des Beobachtungszeitraumes ziemlich konstant, während sie bei den beiden Patienten mit Teratozoospermie deutlich abfiel.

Bezüglich des Verhaltens der "Whiplash"-Bewegung gab es keine einheitliche Tendanz bei dieser Patientengruppe. In den vier Fällen zeigt sich teils eine Zunahme, teils eine Abnahme der "Whiplash"-Bewegung. Zwei Fälle wiesen einen bogenförmigen Verlauf der "Whiplash"-Bewegung mit einem Maximum um die 1. bzw. 3. Stunde auf. Die Heterogenität der Gruppe läßt ein einheitliches Verhalten der "Whiplash"-Bewegung auch nicht erwarten.



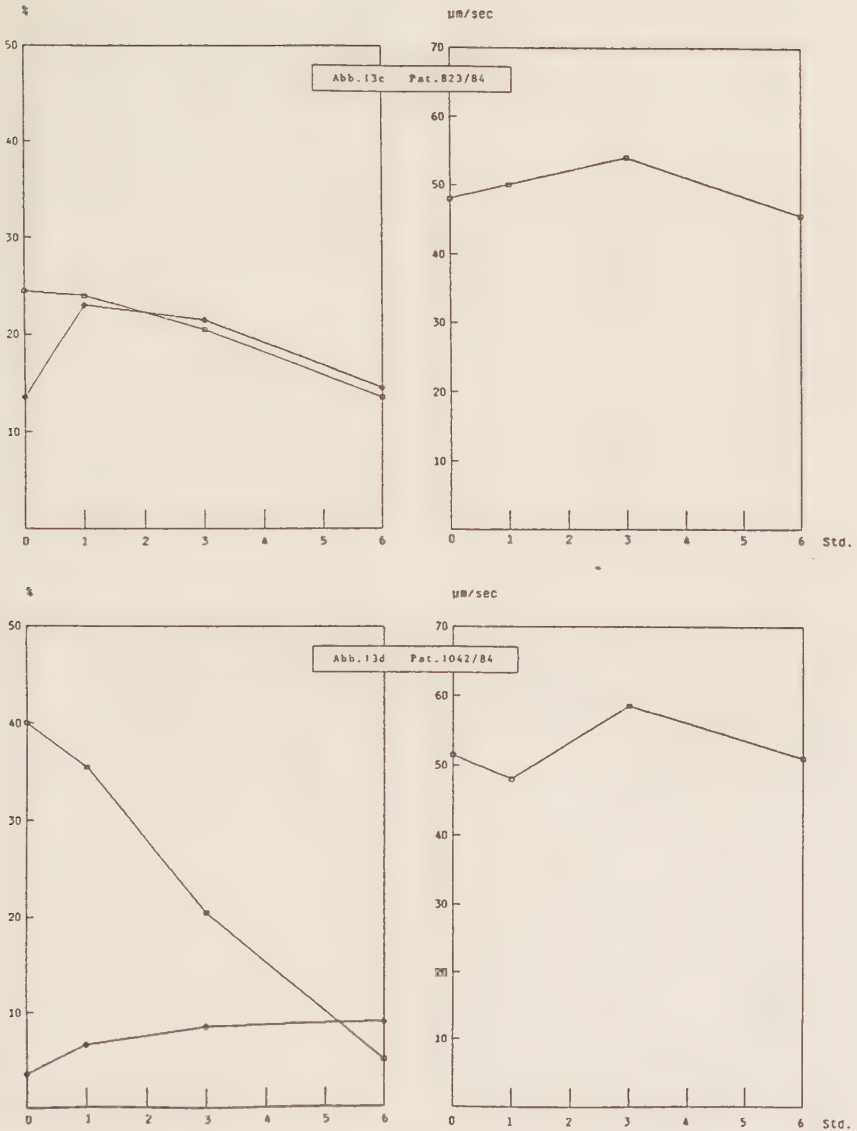
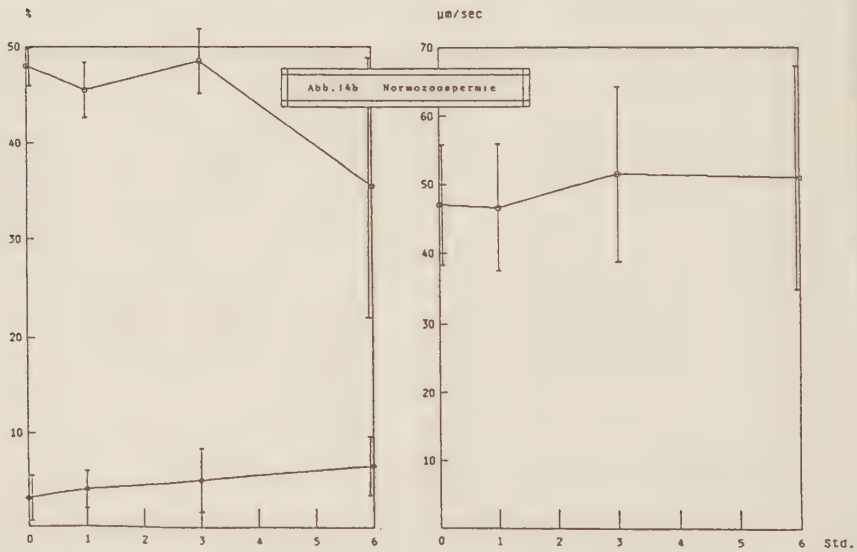
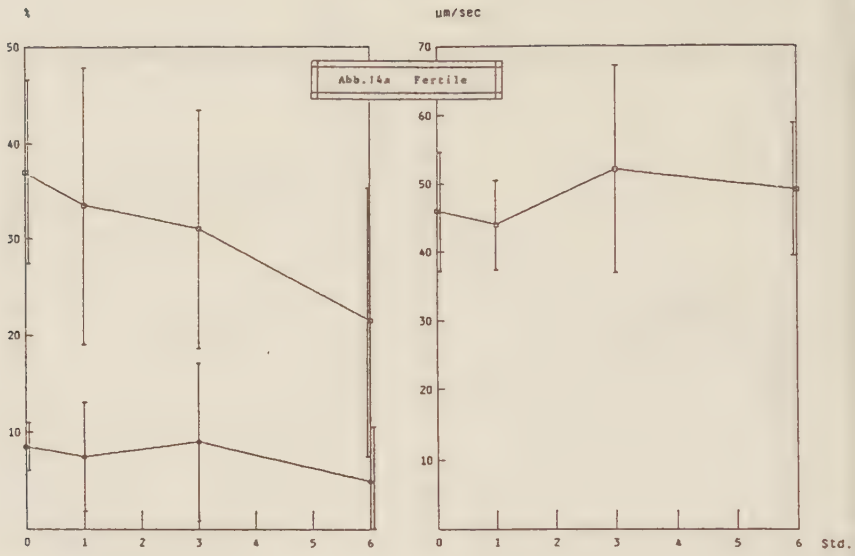


Abb. 13: Motilität, mittlere Geschwindigkeit und "Whiplash"-Bewegung bei zwei Patienten mit Oligoteratozoospermie (a, b) und bei zwei Patienten mit Teratozoospermie (c, d). Zeichenerklärung siehe Abb. 12.



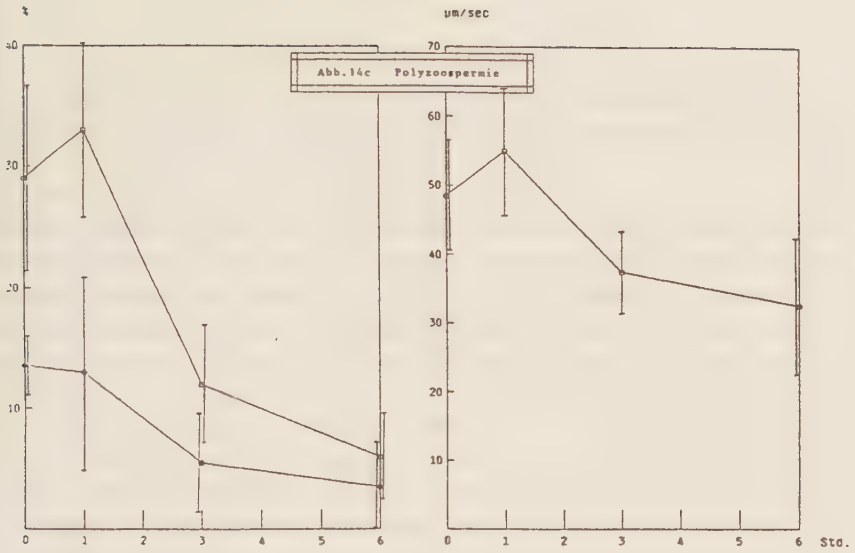


Abb. 14: Motilität, mittlere Geschwindigkeit und "Whiplash"-Bewegung bei der Gruppe der fertilen Männer (a), bei der Normozoospermie-Gruppe (b), und bei der Polyzoospermie-Gruppe (c). Die Kurven geben die Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Werte wieder. Zeichenerklärung siehe Abb. 12. Weitere Erläuterungen im Text.

5. DISKUSSION

5.1 Allgemeines

Frisch ejakulierte Spermatozoen sind noch nicht befruchtungsfähig. Die Fähigkeit zur Befruchtung erlangt das Spermatozoon erst nach einer bestimmten Zeit, in der es bisher weitgehend unbekannte molekulare Veränderungen durchmacht. Diesen Vorgang der Befähigung zur Befruchtung nennt man Kapazitation (Bavister 1973, Bedford 1983, Chang 1984).

Durch den Kapazitationsprozeß erfolgt ein Calcium-Einstrom in die Zelle. Dieser führt zur Auslösung der Akrosomreaktion und zum Auftreten der Hyperaktivierung. Die Akrosomreaktion, die durch multiple Fusionen der äußeren akrosomalen Membran mit der darüberliegenden Plasmamembran zu einer Vesikulation des Akrosoms und schließlich zu einer Freisetzung der akrosomalen Enzyme führt, ist Voraussetzung für eine erfolgreiche Penetration der Eihüllen durch das Spermatozoon. Die peitschenschlagartigen Schwanzbewegungen der hyperaktivierten Spermatozoen ("Whiplash"-Bewegung) erleichtern vermutlich ebenfalls den Penetrationsvorgang (Bedford und Cooper 1978, Meizel 1978, Yanagimachi 1981, Bedford 1983, Yanagimachi und Phillips 1984).

Die Dauer der Kapazitation kann nur indirekt durch den Zeitpunkt des Auftretens von Akrosomreaktion und "Whiplash"-Bewegung bestimmt werden. Da innerhalb einer Spermatozoenpopulation nicht alle Spermatozoen gleichzeitig ihre Kapazitation abschließen, sondern ein asynchrones Auftreten der Akrosomreaktion und der "Whiplash"-Bewegung aufweisen (Bedford 1983), zeigt sich bei der Untersuchung der Kinetik der Akrosomreaktion zunächst über einen bestimmten Zeitraum eine kontinuierliche Zunahme der akrosomenreagierten Spermatozoen. Erst nach mehreren Stunden ist durch zunehmende Absterbevorgänge eine Abnahme der reagierten Spermatozoen festzustellen.

Es war das Ziel dieser Studie, mit Hilfe eines neuen zytochemischen Tests, an den Spermatozoen unterschiedlicher andrologischer Patienten unter besonderer Berücksichtigung von Patienten mit Polyzoospermie die Kinetik der Akrosomreaktion und parallel dazu das Auftreten der "Whiplash"-Bewegung zu untersuchen. Als Vergleichsgruppe für den normalen Ablauf der Akrosomreaktion dienten fertile Männer, die innerhalb der letzten 6 Monate ein Kind gezeugt hatten.

Vermutlich pathologische Verläufe der Akrosomreaktion fanden sich bei Patienten mit unterschiedlichen pathologischen Spermio-grammbefunden (Oligozoospermie, Teratozoospermie, Astenozoospermie). Als sicher pathologisch ist die Akrosomreaktion bei Patienten mit Polyzoospermie anzusehen.

5.2 Methodik

Die gewaschenen Spermatozoen wurden in einem albuminhaltigen TMPA-Medium bei 37°C inkubiert. Es enthält alle für eine optimale Kapazitation erforderlichen Faktoren (vgl. Kap. 2.3.1.5). Nach 0, 1, 3 und 6 Stunden wurden Akrosomreaktion und Motilitätseigenschaften bestimmt.

Da die Akrosomreaktion pH-abhängig ist und im alkalischen Bereich stark beschleunigt abläuft (Hyne und Garbers 1981, Bedford 1983), war es von größter Bedeutung, den pH des bikarbonathaltigen Mediums während des gesamten Versuchsablaufes konstant im Bereich von 7,4 bis 7,8 zu halten. Dies wurde durch kontinuierliche Begasung des Inkubationsmediums mit einem Gemisch von 95 % Luft und 5 % Kohlendioxid erreicht.

Die Untersuchung der Akrosomreaktion erfolgte nach der von Talbot und Chacon (1981) beschriebenen Methode ("Triple-stain"-Technik). Die Motilität wurde mit Hilfe einer mikrophotografischen Dunkelfeldmethode untersucht (modifiziert nach Overstreet et al. 1979).

Bei der "Triple-stain"-Methode wird durch eine Dreifachfärbung (Supravitalfärbung mit Trypanblau; Bismarkbraun- und Bengalrosa-Färbung nach Fixierung) eine Differenzierung von toten (Kopf: blau bis schwarz), unreaktierten lebendigen (Akrosom: rosa) und reaktierten lebendigen Spermatozoen (Akrosom: hell) ermöglicht (s. Abb. 4).

Die in dieser Studie angewandten Auswertungskriterien unterscheiden sich jedoch in zwei Punkten von dem von Talbot und Chacon (1981) vorgeschlagenen Auswertungsmodus:

1. Spermatozoen, deren Akrosom ausgeprägte Zeichen der Vesikulation aufwiesen, wurden zu den akrosomen-reaktierten Spermatozoen gerechnet.
2. Während bei Talbot und Chacon alle Spermatozoen ausgezählt wurden, wurde in dieser Studie zwischen morphologisch intakten und pathologischen Spermatozoen unterschieden. Nur die morphologisch intakten Spermatozoen wurden weiter differenziert in unreaktierte lebendige, reaktierte lebendige und tote Spermatozoen. Dieses Vorgehen ist zwar aufwendiger, entspricht aber unseres Erachtens mehr den in vivo-Bedingungen als der von Talbot und Chacon vorgeschlagene Auswertungsmodus, da am Ort der Befruchtung vorwiegend morphologisch intakte Spermatozoen zu finden sind. Denn ein morphologischer Defekt bedeutet ja meist auch eine Einschränkung der Beweglichkeit der Spermatozoen.

Diese Modifikation des Auswertungsmodus ist vermutlich eine Erklärung dafür, daß bei der normalen Akrosomreaktion ein größerer Anteil akrosomen-reagierter Spermatozoen gefunden wird als von anderen Autoren beschrieben wird, die ebenfalls die "Triple-stain"-Technik verwendeten.

So untersuchten z.B. Reyes und Mitarbeiter (1984) die Akrosomreaktion bei infertilen Patienten mit Oligozoospermie sowie bei einer fertilen Vergleichsgruppe. Dabei fanden sie im Vergleich zu unseren Ergebnissen (Schill und Feifel 1984; Schill et al. 1984, 1985; Töpfer-Petersen et al. 1985 a, b) deutlich niedrigere Werte für den Anteil akrosomen-reagierter Spermatozoen. Bei der fertilen Normalgruppe lagen die 0-Stunden-Werte bei etwa 4% aller Spermatozoen, nach 1 bzw. 2 Stunden betrug der Anteil reagierter Spermatozoen im Mittel 13 bzw. 14% (bei der Oligozoospermie sogar nur 6 bis 7%). Dagegen lag in unseren Untersuchungen der Prozentsatz akrosomen-reagierter Spermatozoen der fertilen Vergleichsgruppe fast doppelt so hoch: Nach 1 bzw. 3 Stunden waren ca. 21% bzw. 27% der morphologisch intakten Spermatozoen reagiert.

Eine weitere kürzlich veröffentlichte Studie von Plachot und Mitarbeitern (1984), bei der im Rahmen eines In-vitro-Fertilisationsprogrammes die Akrosomreaktion der verwendeten Ejakulate untersucht wurde, kam unter Verwendung der gleichen Auswertungskriterien wie die Arbeitsgruppe Reyes zu ähnlichen Ergebnissen: Der Anteil der reagierten Spermatozoen betrug unmittelbar nach Ejakulation etwa 4% und nach einer 17-stündigen Inkubationszeit 16%. Da jedoch zwischen dem 0- und dem 17-Stunden-Wert keine weiteren Werte bestimmt wurden, ist diese Arbeit mit unseren Ergebnissen schwer zu vergleichen.

5.3 Normale Akrosomreaktion

Die Akrosomreaktion ist Voraussetzung für die Befruchtung einer Eizelle durch ein Spermatozoon. Männer mit erwiesener Fertilität müssen daher eine normale Akrosomreaktion aufweisen.

Die Kinetik der Akrosomreaktion fertiler Männer zeigte einen signifikanten Anstieg der akrosomen-reagierten Spermatozoen zwischen dem 0- und dem 3-Stunden-Wert (Abb. 10 oben, linker Kasten). Eine normale Akrosomreaktion fand sich auch bei den Patienten mit Normozoospermie (Abb. 10 Mitte, linker Kasten).

Im rechten Kasten sind jeweils die akrosomen-reagierten Spermatozoen in % der vitalen Spermatozoen dargestellt. Durch diese Darstellungsweise wird die reale Zunahme der Reagierten innerhalb der vitalen Spermatozoen besser verdeutlicht.

Bisher gibt es noch keine klar definierten Kriterien zur Abgrenzung einer normalen Akrosomreaktion von einer pathologischen. Wir beurteilen die Kinetik der Akrosomreaktion vor allem nach dem Ausmaß der Zunahme reagierter Spermatozoen während des Beobachtungszeitraums. Dabei ist allerdings anzumerken, daß der Zeitraum zwischen Ejakulation und Bestimmung des "0-Stunden"-Wertes, der 1 Stunde Wartezeit sowie mehrere Wasch- und einen Färbeprovorgang umfaßt, nicht erfaßt wird. Daher könnte in Einzelfällen, in denen die Akrosomreaktion sehr schnell abläuft, der eigentliche Anstieg der reagierten Spermatozoen bereits vor dem "0-Stunden"-Wert liegen.

Innerhalb der Gruppe der fertilen Männer fielen ebenso wie in der Normozoospermie-Gruppe deutliche Unterschiede im Ablauf der normalen Akrosomreaktion auf. So war z.B. der maximale Anstieg

der reagierten Spermatozoen teils früher, teils später zu beobachten. Außerdem fand sich bei den einzelnen Spendern ein sehr unterschiedlich schnelles Absterben der Spermatozoen (Abb. 6). Auch die Dauer der Kapazitation war bei den einzelnen Probanden unterschiedlich lang. Diese Beobachtung steht im Einklang mit einer Untersuchung von Perreault und Rogers (1982 a) über das "Kapazitationsmuster menschlicher Spermatozoen". Mit Hilfe des Penetrationstests am zona-losen Hamsterei (Yanagimachi et al. 1976) wurde die Befruchtungszeit der Spermatozoen von Männern mit normalen Spermogramm nach unterschiedlicher Inkubationszeit untersucht. Dabei entdeckten sie ausgeprägte interindividuelle Unterschiede des Kapazitationsmusters.

5.4 Pathologische Akrosomreaktion

Neben statistisch auswertbaren Gruppen (fertile Männer, Normozoospermie, Polyzoospermie) wurden bei einer kleinen Gruppe von Patienten mit abnormen Spermogrammbefunden Einzelfall-Analysen der Akrosomreaktion durchgeführt. Bei jeder der beobachteten Störungen (Oligozoospermie, Teratozoospermie und Asthenozoospermie) fanden sich sowohl völlig normale Verläufe der Akrosomreaktion als auch Verläufe mit deutlich abgeschwächten Anstieg der Zahl akrosomen-reagierter Spermatozoen (Abb. 8).

Dabei muß die Frage offenbleiben, in wie weit eine verminderte Zunahme der akrosomen-reagierten Spermatozoen in vitro mit einer entsprechend reduzierten Penetrationsfähigkeit der Eihüllen in vivo korreliert. Wie in elektronenmikroskopischen Beobachtungen festgestellt wurde, läuft die Akrosomreaktion in vivo erst während der Durchwanderung der Eihüllen ab. Das Spermatozoon ist beim ersten Kontakt mit der Eizelle entweder noch unregiert oder in einem sehr frühen Reaktionsstadium (Yanagimachi und Phillips 1984, Genauerer siehe Kap. 2.3.2.5). Dies bedeutet, daß bei der Begegnung mit der Eizelle nicht die Zahl der bereits rea-

gierten sondern die Zahl der unreaktierten bzw. soeben reagierenden Spermatozoen für die Wahrscheinlichkeit des Eintritts der Befruchtung entscheidend ist. Wichtiger als die Geschwindigkeit der Akrosomreaktion erscheint also die Fähigkeit der Spermatozoen, überhaupt eine Akrosomreaktion einzugehen.

Andererseits ist bei einem hohen Ausgangswert von akrosomen-reagierten Spermatozoen anzunehmen, daß ein relativ großer Teil der Spermatozoen bereits vor dem 0-Stunden-Wert reagiert hat. Solch eine überschnelle Akrosomreaktion (z.B. vor der Begegnung mit der Eizelle) ist in vivo vermutlich kein Vorteil, sondern wird eher die Wahrscheinlichkeit einer Befruchtung vermindern, da weniger unreaktierte Spermatozoen für die Penetration der Eihüllen zur Verfügung stehen.

5.5 Akrosomreaktion bei Polyzoospermie

Ganz im Gegensatz zu den oben besprochenen, fraglichen Grenzfällen, die bei Störungen wie Oligozoospermie, Teratozoospermie und Asthenozoospermie beobachtet wurden, handelt es sich bei der Akrosomreaktion der Polyzoospermie-Patienten um eine sicher pathologische Form der Akrosomreaktion.

Bei der Polyzoospermie ist der Anteil der akrosomen-reagierten Spermatozoen während des gesamten Beobachtungszeitraumes sehr niedrig (meist 5 - 10%). Außerdem kommt es zu keinem signifikanten Anstieg der reagierten Spermatozoen. Wie Abb. 10 zeigt, hebt sich somit die Reaktionskinetik bei der Polyzoospermie derart von der Norm ab, daß hier von einer sicher pathologischen Akrosomreaktion gesprochen werden muß. Wahrscheinlich fehlt die Fähigkeit zur Akrosomreaktion bei dem überwiegenden Teil der Spermatozoen völlig. Dies würde die Sub- bzw. Infertilität der Patienten mit Polyzoospermie erklären.

Das Fehlen der Akrosomreaktion kann zwei Ursachen haben:

1. Die Spermatozoen sind unfähig zur Kapazitation. Die unkapazitierten Spermatozoen können folglich auch keine Akrosomreaktion eingehen.
2. Die Spermatozoen weisen ein defektes Akrosom auf. Trotz erfolgter Kapazitation kann der nächste Schritt, die Akrosomreaktion, nicht ablaufen.

Da die Kapazitation nicht nur die Akrosomreaktion, sondern auch die Hyperaktivierung ermöglicht, kann man durch Beobachtung der Motilitätseigenschaften der Spermatozoen während desselben Zeitraums feststellen, ob sie kapazitiert worden sind oder nicht. Dabei spricht ein normales Auftreten der "Whiplash"-Bewegung für eine normale Kapazitation.

5.6 Hyperaktivierung bei Polyzoospermie

Die Motilitätseigenschaften der Spermatozoen, insbesondere das Auftreten der Hyperaktivierung ("Whiplash"-Bewegung) wurde mit Hilfe der beschriebenen Dunkelfeldmethode jeweils parallel zur Akrosomreaktion untersucht. Bei der Polyzoospermie-Gruppe fiel dabei im Vergleich mit den fertilen Männern bzw. mit der Normozoospermie-Gruppe Folgendes auf:

1. Während der Anteil motiler Spermatozoen innerhalb der ersten Stunde nur mäßig erniedrigt war, zeigten sich beim 3- und 6-Stunden-Wert eine starke Abnahme der Motilität sowie eine mäßige Abnahme der mittleren Spermatozoengeschwindigkeit. In Einzelfällen war nach 6 Stunden keine Motilität mehr zu beobachten.

2. Der Anteil der Spermatozoen mit "Whiplash"-Bewegung an der Gesamtzahl motiler Spermatozoen lag innerhalb der ersten Stunde bei Polyzoospermie deutlich höher als bei fertilen Männern und in der Normozoospermie-Gruppe.
3. Im Rahmen des starken Rückgangs der Motilität nahm nach 3 bis 6 Stunden der Anteil der Spermatozoen mit "Whiplash"-Bewegung stark ab.

Es ist bemerkenswert, daß bei Polyzoospermie die Spermatozoen innerhalb der ersten Stunde mit auffallender Konstanz eine starke "Whiplash"-Bewegung aufweisen. Diese Beobachtung läßt den Schluß zu, daß bei Polyzoospermie die Spermatozoen in der Lage sind zu kapazitieren. Das bedeutet aber, daß der Grund für das Fehlen der Akrosomreaktion nicht im Kapazitationsvorgang, sondern bei der Akrosomreaktion selbst zu suchen ist.

Es ist jedoch unklar, womit das überdurchschnittlich starke Auftreten der "Whiplash"-Bewegung innerhalb der ersten Stunde und die starke Abnahme der Motilität nach 3 bis 6 Stunden zu erklären sind. Außerdem bleibt schließlich abzuwarten, ob sich diese Beobachtungen bei Untersuchungen an weiteren Polyzoospermie-Patienten bestätigen lassen.

5.7 Weitere Befunde bei Polyzoospermie

Parallel zu diesen Untersuchungen wurden bei der Polyzoospermie-Gruppe weitere Befunde erhoben. Die Ergebnisse weisen ebenfalls auf eine funktionelle Störung der Spermatozoen hin. Diese könnte die Erklärung dafür sein, daß bei Polyzoospermie trotz des Vorhandenseins überdurchschnittlich vieler Spermatozoen im Ejakulat nur selten Konzeptionen beobachtet werden.

Bisher gab es nur wenige Studien über die Ursachen der Subfertilität bei Polyzoospermie. Es gibt einige Hinweise, die für einen genetischen Defekt der Spermatozoen sprechen. So wurden mit Hilfe zytophotometrischer Einzelzellmessungen nach Feulgenfärbung deutlich erniedrigte DNS-Werte gefunden (Meyhöfer 1963). Auch kürzlich durchgeführte impulszytophotometrische Messungen der Spermatozoen-DNS weisen auf eine erhöhte Rate defekter Spermatozoen bei Polyzoospermie hin (Vogt et al. 1984).

Schill beobachtete bereits 1974 bei 2 Patienten mit Polyzoospermie deutlich erniedrigte Werte für das intraakrosomal gelegene Penetrationsenzym Akrosin. Um diesem ersten Hinweis auf eine akrosomale Funktionsstörung bei Polyzoospermie weiter nachzugehen, wurden daher im Rahmen einer größeren Studie neben der Akrosomreaktion vor allem die Akrosinaktivitäten und das Vorhandensein eines Akrosininhibitors untersucht (Schill und Feifel 1984; Schill et al. 1984, 1985). Im Vergleich zur Normozoospermie ließ sich bei der Polyzoospermie eine hochsignifikante Verminderung der Gesamtakrosinaktivität um bis zu 59% nachweisen. Deutlich erniedrigte Werte wurden auch für freies Akrosin bzw. Proakrosin gefunden. Das Verhältnis Proakrosin zu aktivem Enzym zeigte in beiden Untersuchungsgruppen nur geringe Differenzen. Bezüglich der Erniedrigung der Gesamtakrosinaktivität stellt die Polyzoospermie-Gruppe eine ziemlich einheitliche Patientengruppe dar und hebt sich deutlich von den Werten bei Normozoospermie ab.

Im Gegensatz zu den Befunden bei der Akrosomreaktion wies die Akrosinaktivität eine Abhängigkeit von der sexuellen Karenzzeit auf. Bei eintägigen Karenzzeit lag die Gesamtakrosinaktivität im Mittel signifikant über dem entsprechenden Wert bei einer 6- bis 7-tägigen Karenzzeit, was vermutlich auf Alterungsprozesse der Spermatozoen zurückzuführen ist.

Der beträchtlich erniedrigte Akrosingehalt bei Polyzoospermie führte zu der Frage, ob die Akrosinaktivität pro Spermatozoon erniedrigt ist oder dadurch bedingt ist, daß der prozentuale Anteil akrosin-negativer Spermatozoen stark angestiegen ist. Es wurden daher immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an Ausstrichpräparaten unter Verwendung kreuzreagierender monospezifischer Antikörper gegen Eberakrosin durchgeführt. Bei den untersuchten Patienten mit Polyzoospermie war der Anteil akrosin-negativer Spermatozoen gegenüber der Norm nicht verändert. Bei durchschnittlich 70% der Spermatozoen war das Penetrationsenzym Akrosin im Akrosom nachweisbar. Dieser Befund weist auf eine Erniedrigung der mittleren Akrosinaktivität pro Spermatozoon hin und läßt eine Erhöhung des Anteils akrosinnegativer Spermatozoen ausschließen.

Von besonderen Interesse war das Verhalten eines erst kürzlich beschriebenen intraakrosomalen basischen Akrosininhibitors (Tschesche et al. 1982), dessen Nachweis ebenfalls mit Hilfe kreuzreagierender Antikörper gegen Eberakrosininhibitor möglich war. Dieser Inhibitor konnte im Mittel nur bei 15 % der Spermatozoenpopulationen nachgewiesen werden, während er bei Normozoospermie in 70 - 80% der Spermatozoen nachweisbar ist. Ob der Mangel an Inhibitor zu einer Selbstverdauung des Akrosins und somit zu einem funktionell defekten Akrosom führt, muß gegenwärtig offen bleiben.

Diese Ergebnisse weisen auf eine ausgeprägte Störung des Akrosin-Inhibitor-Systems bei Polyzoospermie hin. Dadurch wird vermutlich bei dieser Patientengruppe das normale Auftreten einer Akrosomreaktion verhindert.

6. SCHLUSSFOLGERUNG

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse weisen auf eine gravierende funktionelle Störung des Akrosoms bei Polyzoospermie hin. Während bei dieser Patientengruppe die Fähigkeit der Spermatozoen zur Kapazitation ungestört erscheint, läuft die akrosomale Reaktion innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 6 Stunden nicht ab. Das Fehlen der Akrosomreaktion sowie die parallel dazu nachgewiesene Störung des Akrosin-Inhibitor-Systems (Schill und Feifel 1984; Schill et al. 1984) erklären die Beobachtung, daß der überwiegende Teil der Spermatozoen von Männern mit Polyzoospermie trotz normaler Morphologie befruchtungsunfähig sind, da die Hüllen der Eizelle nur von Spermatozoen mit funktionell intaktem Akrosom penetriert werden können.

Die gestörte akrosomale Reaktion, das Fehlen des Akrosininhibitors und die deutliche Erniedrigung der Akrosinaktivität sind bisher nicht sicher zu erklären. Die vorgelegten Ergebnisse geben jedoch konkrete Hinweise auf ein funktionell defektes Akrosom bei Polyzoospermie und erklären somit die beobachtete Subfertilität dieser Patientengruppe.

Folgendes Denkmodell könnte die Befunde bei der Polyzoospermie erklären und in einen kausalen Zusammenhang bringen:

Die primäre Störung könnte beispielsweise in einem Defekt während der Synthese des Akrosininhibitors im Verlauf der Spermio-genese zu suchen sein. Das Fehlen des Inhibitors führt dann zu einer vorzeitigen Aktivierung des Akrosins und somit zu einer Schädigung des akrosomalen Inhalts durch das hochaggressive, trypsinähnliche Penetrationsenzym. Das dermaßen geschädigte Akrosom ist nun unfähig, eine normale Akrosomreaktion einzugehen.

Doch das Fehlen des Inhibitors ist möglicherweise nicht nur die Ursache der akrosomalen Funktionsstörung, sondern auch verantwortlich für die hohe Spermatozoendichte bei Polyzoospermie. Dabei sind folgende pathogenetische Mechanismen denkbar:

1. Die hohen Spermatozoenzahlen bei der Polyzoospermie könnten die Folge einer kompensatorischen Überproduktion sein, die einen Versuch darstellt, die Minderwertigkeit der gebildeten Spermatozoen auszugleichen.
2. Dem Akrosininhibitor kommt möglicherweise eine regulatorische Funktion bei der Spermatogenese zu. Das Fehlen des Inhibitors bei der Polyzoospermie würde demnach zu einer unkontrollierten Spermatozoenproduktion führen.

Falls diese Überlegungen zutreffen sollten, wäre die hohe Spermatozoendichte bei Polyzoospermie keine primäre Störung, sondern die Folge einer gestörten Inhibitorsynthese während der Spermiogenese. Ob es sich allerdings bei der Polyzoospermie tatsächlich um eine Krankheitsentität oder um ein Symptom einer heterogenen Gruppe von Störungen multifaktoriellen Ursprungs handelt, muß offen bleiben und sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

Unter klinisch-diagnostischen Aspekten erlaubt die quantitative Bestimmung der Akrosinaktivität, des Inhibitors und der Akrosomreaktion bei Polyzoospermie-Patienten den funktionellen Zustand des Akrosoms zu beurteilen. Auf diese Weise ist eine Differenzierung möglich zwischen Patienten, die einen funktionellen Defekt des Akrosoms aufweisen, und solchen, deren akrosomale Funktionen erhalten sind und damit eine gute Prognose im Hinblick auf eine Konzeption haben.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Bevor Spermatozoen zur Akrosomreaktion und zur "Whiplash"-Bewegung (hyperaktivierter Bewegungstyp) befähigt sind, müssen sie sich entweder einige Zeit im weiblichen Genitaltrakt oder - in vitro - eine entsprechende Zeit in einem Inkubationsmedium aufhalten, das eine Reihe biochemischer Voraussetzungen erfüllen muß. Diesen Prozeß der Befähigung zur Akrosomreaktion und "Whiplash"-Bewegung und somit zur Befruchtung einer Eizelle wird Kapazitation genannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der von Talbot und Chacon (1981) beschriebenen "Triple-stain"-Technik (Dreifachfärbung) der Verlauf der Akrosomreaktion nach Inkubation in einem In-vitro-Fertilisationsmedium bei verschiedenen andrologischen Patienten sowie bei fertilen Männern über einen Zeitraum von 6 Stunden beobachtet. Eine normale Akrosomreaktion mit einem Maximum der akrosomen-reagierten Spermatozoen nach 1 - 3 Stunden fand sich bei den Patienten mit erwiesener Fertilität sowie bei den Patienten mit normalem Spermioogramm. Auch bei Untersuchungen an verschiedenen Ejakulaten mit unterschiedlichen Auffälligkeiten im Spermioogramm (Oligozoospermie, Teratozoospermie, Asthenozoospermie) fanden sich zum Teil normale Akrosomreaktionen, zum Teil aber auch veränderte Reaktionsverläufe mit einer nur geringen Zunahme der Zahl akrosomen-reagierter Spermatozoen innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 6 Stunden.

Sicher pathologische Befunde wiesen dagegen 19 Patienten mit Polyzoospermie auf, bei denen trotz sehr hoher Spermatozoenzahlen (> 250 Mill./ml) Schwangerschaften nur sehr selten beobachtet werden. Bei diesen Patienten fehlte die akrosomale Reaktion völlig.

Die gleichzeitige Untersuchung der Motilitätseigenschaften der Spermatozoen mit Hilfe einer mikrophotographischen Dunkelfeldmethode (modifiziert nach Overstreet et al. 1979) führte zu dem Ergebnis, daß bei Polyzoospermie ähnlich wie bei Normozoospermie und fertilen Männern eine ausgeprägte "Whiplash"-Bewegung auftritt, die bei Polyzoospermie-Patienten sogar früher und stärker in Erscheinung zu treten scheint. Dies spricht dafür, daß die Kapazitation bei Polyzoospermie ungestört abläuft. Der funktionelle Defekt der Spermatozoen ist daher bei der Akrosomreaktion selbst zu suchen.

Der Befund einer fehlenden Akrosomreaktion bei Polyzoospermie wurde durch weitere Untersuchungen bestätigt, die ein fast völliges Fehlen des Akrosininhibitors sowie eine deutlich erniedrigte Akrosinaktivität bei Polyzoospermie zeigen (Schill und Feifel 1984; Schill et al. 1984) und ebenfalls auf einen funktionellen Defekt des Akrosoms bei dieser Patientengruppe hinweisen. Demnach muß bei Polyzoospermie eine zelluläre Störung während der Spermiogenese angenommen werden. Die in dieser Studie vorgelegten Ergebnisse geben somit erstmals eine plausible Erklärung für die bei der Polyzoospermie beobachtete Sub- bzw. Infertilität.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Aitken, R.J. (1983)
Clinical assessment of sperm function
J. Obstet Gynaec. 3 (Suppl. 2): 48 - 52
2. Aitken, R.J., Templeton, A. Schats, R., Best, F.,
Richardson, D., Djahanbakck, O. Lees, M. (1983)
Methods for assessing the functional capacity of human
spermatozoa; their role in the selection of patients
for in vitro fertilization.
In: Fertilization of the Human Egg In Vitro (H.M. Beier
and H.R. Lindner, eds.)
Springer-Verlag, Berlin, pp 147 - 165
3. Ascott, T.S., Katz D.F. and Hoskins, D.D. (1983)
Movement characteristics of bovine epididymal spermato-
zoa: effects of forward motility protein and epididymal
maturation.
Biol. Reprod. 29 : 389 - 399
4. Austin, C.R. (1951)
Observations on the penetration of sperm into the mamma-
lian egg.
Aust. J. Sci Res. (Series B) 4 : 581 - 596
5. Austin, C.R. (1952)
The "Capacitation" of mammalian sperm
Nature 170 : 326
6. Austin, C.R., Bishop, M.W.H. (1958)
Role of the rodent acrosome and perforation in
fertilization.
Proc. Roy. Soc. Br. 149 : 241 - 248

7. Austin, C.R., Bavister, B.D. and Edwards, R.G. (1973)
Components of capacitation
In: The Regulation of Mammalian Reproduction (S.J. Seegal, R. Crozier, P.A. Corfman and P.G. Condcliffe, eds.)
Charles C. Thomas, Springfield, IL, pp. 247 - 256
8. Austin, C.R. (1975)
Membrane fusion events in fertilization
J. Reprod. Fertil 44 : 155 - 166
9. Barros, C., Austin, C.R. (1967)
In vitro fertilization and sperm acrosome reaction in the hamster
J. Exp. Zool. 166 : 317 - 324
10. Barros, C., Bedford, J.M., Franklin, L.F., Austin, C.R. (1967)
Membrane vesiculation as a feature of the mammalian acrosome reaction
J. Cell. Biol. 34 : c1 - c5
11. Barros, C. (1968)
In vitro capacitation of golden hamster spermatozoa with fallopian tube fluid of the mouse and rat
J. Reprod. Fertil. 17 : 203 - 206
12. Barros, C., Berrios, M., Herrera, E. (1973)
Capacitation in vitro of guinea pig spermatozoa in saline solution
J. Reprod. Fertil 34 : 547 - 549
13. Barros, C. (1974)
Capacitation of mammalian spermatozoa
In: Physiology and Genetics of Reproduction, chapter 27, part B (E.M. Coutinho and F. Fuchs, eds.)
Plenum Press, New York, pp. 3 - 24

14. Barros, C. and Berrios, M. (1977)
Is the activated spermatozoon really capacitated?
J. Exp. Zool. 201 : 65 - 72
15. Barros, C., Gonzales, J., Herrera, E., Bustos-Obregon, E. (1978)
Human sperm penetration into zona-free hamster oocytes as a test to evaluate sperm fertilizing ability
Andrologia 11 : 197 - 210
16. Bavister, B.D. (1973)
Capacitation of hamster spermatozoa during incubation in culture medium
J. Reprod. Fertil 35 : 161 - 163
17. Bavister, B.D. and Yanagimachi, R. (1977)
The effects of sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster spermatozoa in vivo
Biol. Reprod. 16 - 228 - 237
18. Bedford, J.M. (1968)
Ultrastructural changes in the sperm head during fertilization in the rabbit
Am. J. Anat. 123 : 329 - 358
19. Bedford, J.M. (1970 a)
Morphological aspects of sperm capacitation in mammals.
Adv. Biosci. 4 : 35
20. Bedford, J.M. (1970 b)
Sperm capacitation and fertilization in mammals
Biol. Reprod. (Suppl.) 2 : 128 - 158

21. Bedford, J.M. (1974)
Mechanisms involved in penetration of spermatozoa through the vestments of the mammalian egg.
In: Physiology and Genetics of Reproduction, part B (E.M. Coutinho and F. Fuchs, eds.)
Plenum Publ. New York, pp. 55 - 68
22. Bedford, J.M. (1975)
Maturation transport, and fate of spermatozoa in the epididymis
In: Handbook of Physiology, Edited by D.W. Hamilton, and R.O. Greep, Sect. 7: Endocrinology, Vol. 5: Male Reproductive System.
American Physiological Society, Washington DC, pp, 303 - 317
23. Bedford, J.M. and Cooper, G.W. (1978)
Membrane fusion events in fertilization of vertebrate eggs.
In: Cell Surface Reviews (G. Poste, G.L. Nicolson, eds.)
North-Holland Publ., Amsterdam, Vol. 5, pp. 65 - 125
24. Bedford, J.M. (1983)
Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals.
Biol. Reprod. 28 : 108 - 120
25. Bishop, D.W. and Tyler, A. (1956)
Fertilizin of mammalian eggs
J. Exp. Zool. 132 : 575 - 595
26. Blandau, R.J. (1969)
Gamete transport-comparative aspects.
In: Hafez, E.S.E., R.J. Blandau (eds.): The mammalian oviduct pp. 129 - 162.
Univ. of Chicago Press, Chicago

27. Brown, C.R. and Harrison, R.A.P. (1978)
The activation of proacrosin in spermatozoa from ram, bull and boar.
Biochim. Biophys. Acta 526 : 202 - 217
28. Chang, M.C. (1951)
Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes
Nature 168 : 697 - 698
29. Chang, M.C. (1959).
Fertilization of rabbit ova in vitro
Nature 184 : 466 - 467
30. Chang, M.C. (1984)
The meaning of sperm capacitation. A historical perspective.
J. Androl. 5 : 45 - 50
31. Cooper, G.W., Overstreet, J.W., Katz, D.F. (1979)
The motility of rabbit spermatozoa recovered from the female reproductive tract.
Gamete Res. 2 : 35 - 42
32. Cooper, T.G. (1984)
The onset and maintenance of hyperactivated motility of spermatozoa from the mouse
Gamete Res. 9 : 55 - 74
33. Crozet, N. and Dumont, M. (1984) 
The site of the acrosome reaction during in vivo penetration of the sheep oocyte
Gamete Res. 10 : 97 - 105

34. Cummins, J.M. (1982)
Hyperactivated motility patterns of ram spermatozoa recovered from the oviducts of mated ewes
Gamete Res. 6 : 53 - 63
35. Cummins, J.M. and Yanagimachi, R. (1982)
Sperm-egg ratios and the site of the acrosome reaction during in vivo fertilization in the hamster.
Gamete Res. 5 : 239 - 256
36. Dan, J.C. (1952)
Studies on the acrosome I. Reactions to egg-water and other stimuli
Biol. Bull. 103 : 54 - 56
37. Dan, J.C. (1956)
The acrosome reaction
Int. Rev. Cytol. 5 : 365 - 393
38. Doak, R.L., Hall, A., and Dale, H.E. (1967)
Longevity of spermatozoa in the reproductive tract of the bitch
J. Reprod. Fertil. 13 : 51 - 58
39. Dravland, E. and Meizel, S. (1981)
Stimulation of hamster sperm capacitation and acrosome reaction in vitro by glucose and lactate and inhibition by the glycolytic inhibitor -chlorohydrin
Gamete Res. 4 : 515 - 523
40. Dudenhausen, E. and Talbot, P. (1981)
Detection and kinetics of the normal acrosome reaction of mouse sperm.
J. Cell Biol. 91 : 167 a

41. Edwards, R.G., Bavister, B.D., Steptoe, P.C. (1969)
Early stages of fertilization in vitro of human oocytes
Nature 221 : 632 - 635
42. Eliasson, R. (1965)
Effect of frequent ejaculations on the composition of
human seminal plasma
J. Reprod. Fertil. 9 : 331 - 336
43. Eliasson, R., Johnson, O., and Lindholmer, C. (1974)
Effects of seminal plasma on some functional properties
of human spermatozoa.
In: Mancini, R.E., and Martini, L., (eds.): Male
fertility and sterility, New York, Academic Press, Inc.
pp. 107 - 122
44. Florman, H.M. and Storey, B.T. (1982)
Mouse gamete interactions: The zona pellucida is the
site of the acrosome reaction leading to fertilization
in vitro.
Dev. Biol. 91 : 121 - 130
45. Fraser, L.E. (1977)
Motility pattern in mouse spermatozoa before and after
capacitation
J. Exp. Zool. 202 : 439 - 444
46. Fraser, L.R. (1981)
Dibutyryl cyclic AMP decreases capacitation time in vi-
tro in mouse spermatozoa.
J. Reprod. Fertil. 62 : 63 - 72
47. Fraser, L.R., Quinn, P.J. (1981)
A glycolytic product is obligatory for initiation of
the sperm acrosome reaction and whiplash motility requi-
red for fertilisation in the mouse
J. Reprod. Fertil 61 : 25 - 35

48. Fraser, L.R. (1982)
Ca²⁺ is required for mouse sperm capacitation and fertilization in vitro
J. Androl. 3 : 412 - 419
49. Fray, C.S., Hoffer, A.P., and Fawcett, D.W. (1972)
A re-examination of motility patterns of rat epididymal spermatozoa.
Anat. Rec. 173 : 301 - 308
50. Fuchs, H. and Belonoschkin, B. (1942)
Biologie der Spermatozoen in menschlichen Hoden und Nebenhoden.
Arch Gynaekol 174 : 357
51. Green, D.P.L. (1978 a)
The induction of the acrosome reaction in guinea-pig sperm by the divalent metal cation ionophore A 23187
J. Cell. Sci. 32 : 137 - 151
52. Green, D.P.L. (1978 b)
The activation of proteolysis in the acrosome reaction of guinea-pig sperm.
J. Cell. Sci. 32 : 153 - 164
53. Gwatkin, R.B.L., Carter, H.W., Patterson, H. (1976)
Association of mammalian sperm with cumulus cells and the zona pellucida studied by scanning electron microscopy.
Scanning Electron Microscopy (part VI). Proceeding of the Workshop on SEM in Reproductive Biology, Chicago, Illinois: pp. 379 - 384
54. Hammer, C.E. and Williams, W.L. (1963)
Effect of the female reproductive tract on sperm metabolism in the rabbit and fowl.
J. Reprod. Fertil. 5 : 143 - 150

55. Harvey, C. (1954)
An experimental study of the penetration of human cervical mucus by spermatozoa in vitro
J. Obstet. Gynaecol. Br. Commonw. 61 : 480 - 490
56. Hermanns, U., Hafez, E.S.E. (1981)
Andrological evaluation of oligozoospermic men for homologous artificial insemination.
In: Oligozoospermia: recent progress in andrology (G. Frajes et al., eds.)
Raven, New York, pp. 455 - 461
57. Hicks, J.J., Martinez-Manautou, J., Pedron, N., Rosado, A. (1972)
Metabolic changes in human spermatozoa related to capacitation
Fertil. Steril. 23 : 172 - 179
58. Hinrichsen, M.J., and Blaquier, J.A. (1980)
Evidence supporting the existence of sperm maturation in the human epididymis
J. Reprod. Fertil. 60 : 291 - 294
59. Huang, T.T.F., Fleming, A.D., Yanagimachi, R. (1981)
Only acrosome-reacted spermatozoa can bind to and penetrate zona pellucida: a study using the guinea-pig.
J. Exp. Zool. 217 : 287 - 290
60. Hyne, R.V. and Garbers, D.L. (1979 a)
Calcium-dependent increase in adenosine 3', 5'- monophosphate and induction of the acrosome reaction in guinea-pig spermatozoa.
Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 76 : 5699 - 5703

61. Hyne, R.V. and Garbers, D.L. (1979 b)
Regulation of guinea-pig sperm adenylate cyclase by calcium.
Biol. Reprod. 21 : 1135 - 1142
62. Hyne, R.V. and Garber, D.L. (1981)
Requirement of serum factors for capacitation and the acrosome reaction of guinea-pig spermatozoa in buffered medium below pH 7,8
Biol. Reprod. 24 : 257 - 266
63. Igarashi, M. (1978)
In: Reproductive and Gynecologic Endocrinology
Nanzando Co. Ltd. Tokyo
64. Iwamatsu, T., Chang, M.C. (1969)
In vitro fertilization of mouse eggs in the presence of bovine follicular fluid.
Nature 224 : 919 - 920
65. Johnson, L.L., Katz, D.F., Overstreet, J.W. (1981)
The movement characteristics of rabbit spermatozoa before and after activation.
Gamete Res. 4 : 275 - 282
66. Jones, R.C. (1973)
Changes occurring in the head to boar spermatozoa: vesiculation or vacuolation of the acrosome?
J. Reprod. Fertil. 33 : 113 - 118
67. Katz, D.F., Yanagimachi, R., Dredner, R.D. (1978)
Movement characteristics and power output of guinea-pig and hamster spermatozoa in relation to activation.
J. Reprod. Fertil. 52 : 167 - 172

68. Katz, D.F. and Yanagimachi, R. (1980)
Movement characteristics of hamster spermatozoa within the oviduct.
Biol. Reprod. 22 : 759 - 764
69. Katz, D.F., Overstreet, J.W., Hanson, F.W. (1980)
A new quantitative test for sperm penetration into cervical mucus.
Fertil. Steril. 33 : 179 - 186
70. Katz, D.F., and Yanagimachi, R. (1981)
Movement characteristics of hamster and guinea-pig spermatozoa upon attachment to the zona pellucida
Biol. Reprod. 25 : 785 - 791
71. Koch, U.J., Zielske, F., Hammerstein, J. (1974)
Nachweis der Spermatozoenaszension im weiblichen Genitaltrakt als Routineuntersuchung in der Sterilitätsdiagnostik
40. Tg. Deut. Ges. Gyn. Geb., Wiesbaden
Archiv. Gyn. (abstr.)
72. Kremer, J. (1965)
A simple penetration test
Int. J. Fertil. 10 : 209 - 215
73. Krstić, R.V. (1976)
Ultrastruktur der Säugetierzelle.
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg
74. Lambert, H. (1981)
Temperature dependence of capacitation in bat sperm monitored by zona-free hamster ova.
Gamete Res. 4 : 525 - 533
75. Lui, C.W. and Meizel, S. (1979)
Further evidence in support of a role for hamster sperm hydrolytic enzymes in the acrosome reaction.
J. Exp. Zool. 207 : 173 - 185

76. Lysikiewicz, A., and Enhorning, G. (1983)
Tricolor photography for assesement of spermatozoa motility
Amer. J. Obstet. Gynaec. 145 : 229 - 233
77. MacLeod, J., Martens, F., Silberman, C., and Sobrero, A.J. (1959)
The post-coital and post-insemination cervical mucus and semen quality.
Stud. Fertil. 10 : 41
78. Mahi, C.A. and Yanagimachi, R. (1976)
Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes in vitro
J. Exp. Zool. 196 : 189 - 196
79. Makler, A. (1978 a)
A new multiple exposure photography method for objective sperm motility determination.
Fertil. Steril. 30 : 192 - 199
80. Makler, A. (1978 b)
A new chamber for rapid sperm count and motility estimation.
Fertil. Steril. 30 : 313 - 318
81. Meizel, S. and Lui, C.W. (1976)
Evidence for the role of a trypsin-like enzyme in the hamster sperm acrosome reaction.
J. Exp. Zool. 195 : 137 - 144
82. Meizel, S. (1978)
The mammalian sperm acrosome reaction, a biochemical approach.
In: Development in Mammals, vol. 3 (M.H. Johnson, ed.)
North-Holland, Publ., Amsterdam, pp. 1 - 64

83. Metz, C.B. (1967)
Gamete surface components and their role in fertilization.
In: Fertilization, vol.1 (C.B. Metz and A. Monroy, ed.)
Academic Press, New York, pp. 163 - 236
84. Meyhöfer, W. (1963)
Mikrospektrophotometrische Messungen des Nukleinsäuregehaltes von Spermatozoen fertiler und infertiler Männer.
Arch. klin. exp. Dermat. 216 : 556 - 614
85. Mitchell, J.A., Nelson, L., and Hafez, E.S.E. (1976)
Motility of spermatozoa
In: Human Semen and Fertility Regulation in Man.
Edited by Hafez E.S.E, CV Mosby Co., Saint Louis, p. 83
86. Miyamoto, H., Chang, M.C. (1973)
The importance of serum albumin and metabolic intermediates for capacitation of spermatozoa and fertilization of mouse eggs in vitro.
J. Reprod. Fertil. 32 : 193 - 205
87. Moghissi, K.S. (1972)
Sperm migration through the human cervix
In: Cervical mucus in human reproduction
World Health Organization Colloquium Geneva
Chapter II, pp. 128 - 152
88. Mohsenian, M., Syner, F. and Moghissi, K. (1981)
Study of sperm acrosin in patients with unexplained infertility
Fertil. Steril. 35 : 255 (Abstr)
89. Mooney, J.K., Horan, A.H., and Lattmer, J.K. (1972)
Motility of spermatozoa in the human epididymis
J. Urol. 108 : 443 - 445

90. Morita, Z., and Chang, M.C. (1970)
The motility and aerobic metabolism of spermatozoa in laboratory animals with special reference to the effects of cold shock and the importance of calcium for the motility of hamster-spermatozoa.
Biol. Reprod. 3 : 169 - 179
91. Morton, B., Harrigan-Lum, J., Albagli, L., Jooss, T. (1974)
The activation of motility in quiescent hamster sperm from the epididymis by calcium and cyclic nucleotides.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 56 : 372 - 379
92. Mounib, M.S. and Chang, M.C. (1964)
Effect of in utero incubation on the metabolism of rabbit spermatozoa.
Nature 201 : 943 - 944
93. Mujica, A. and M.A. Valdes Ruiz (1983)
On the role of glucose in capacitation and acrosomal reaction of guinea-pig sperm.
Gamete Res. 8 : 335 - 344
94. Murdoch, R.N., and White, I.G. (1968)
Metabolic studies of testicular, epididmal, and ejaculated spermatozoa of the ram
Aust. J. Biol. Sci. 21 : 111 - 121
95. Overstreet, J.W. and Cooper G.W. (1979)
The time and location of the acrosome reaction during sperm transport in the female rabbit.
J. Exp. Zool. 209 : 97 - 104

96. Overstreet, J.W., Katz, D.F., Hanson, F.W., Fonseca, J.R. (1979)
A simple inexpensive method for objective assessment of human sperm movement characteristics.
Fertil. Steril. 31 : 162 - 172
97. Overstreet, J.W., Katz, D.F., Johnson, L.L. (1980)
Motility of the rabbit spermatozoa in the secretions of the oviduct.
Biol. Reprod. 22 : 1083 - 1088
98. Perreault, S.D. and Rogers, B.J. (1982 a)
Capacitation pattern of human spermatozoa
Fertil. Steril. 38 : 258 - 260
99. Perreault, S.D. and Rogers, B.J. (1982 b)
Relationship between fertilizing ability and cAMP in human spermatozoa.
J. Androl. 3 : 396 - 401
100. Pickworth, S., Chang, M.C. (1969)
Fertilization of chinese hamster eggs in vitro.
J. Reprod. Fertil. 19 : 371 - 374
101. Piko, L., Tyler, A. (1964)
Fine structural studies of sperm penetration in the rat.
Proc. Vth Int. Cong. Anim. Reprod. and AJ Trento
2 : 372 - 377
102. Plachot, M., Mandelbaum, J., Junca, A.-M. (1984)
Acrosome reaction of human sperm used for in vitro fertilization.
Fertil. Steril. 42 : 418 - 423

103. Reyes, A., Martinez, R., Luna, M., Chavarria, M.E. and Merino, G. (1984)
Quantitative evaluation of the human spermatozoal motility and acrosome reaction in infertile oligozoospermic and fertile euspermic men.
Arch. Androl. 12 : 187 - 194
104. Rogers, B.J., Yanagimachi, R. (1975)
Retardation of guinea-pig sperm acrosome reaction by glucose: The possible importance of pyruvate and lactate metabolism in capacitation and the acrosome reaction.
Biol. Reprod. 13 : 568 - 575
105. Rogers, B.J. (1981)
Factors affecting mammalian in vitro fertilization.
In: Bioregulators of Reproduction (G. Jagiello and H.T. Vogel, eds.)
Academie Press, New York, pp. 459 - 486
106. Rosado, A., Delgads, N.M., Huacuja L. and Hernandez, O. (1982)
Role of Seminal Plasma and Sperm Fertilizability
In: Instrumental Insemination (Hafez, E.S.E. and Semm, K., eds.)
Martinus Nijhoff Publishers pp. 35 - 52
107. Saito, S., Bush, I.M. and Whitmore, W.F., Jr. (1967 a)
Effects of certain metals and chelating agents on rat and dog epididymal spermatozoan motility.
Fertil. Steril. 18 : 517 - 529

108. Saito, S., Bush, I.M., MacKenzie, A.R., and Whitmore, W.F., Jr. (1967 b)
The effects of certain metals and chelating agents on the motility of dog epididymal and ejaculated spermatozoa.
Invest. Urol. 4 : 546 - 555
109. Schill, W.-B. (1974)
Quantitative determination of acrosin activity in human spermatozoa.
Fertil. Steril. 25 : 703 - 712
110. Schill, W.-B., Feifel, M. (1984)
Low acrosin activity in polyzoospermia.
Andrologia 16 : 589 - 591
111. Schill, W.-B., Töpfer-Petersen, E., Flörke-Gerloff, S., Völcker, Ch., Engel, W., Tschesche, Müller-Esterl und Schmidt (1984)
Nachweis eines funktionell defekten Akrosoms als Ursache der Infertilität bei Polyzoospermie
Tagung der Arbeitsgemeinschaft dermatologischer Forschung Lübeck 23. - 25.11.1984 (abstr.)
112. Schill, W.-B., Töpfer-Petersen, E., Flörke-Gerloff, S., Schmidt, G.J., Völcker, Ch., Engel, W., Feifel, M., (1985)
Polyzoospermia: evidence for a functional defect acrosome.
IIIrd International Congress of Andrology, Boston
27.4 - 2.5.1985 (abstr.)

113. Schirren, C., Laudahn, G., Hartmann, E. and Heinze, I. (1977)
Studies of the correlation of morphological and biochemical parameters in human ejaculate in various andrological diagnoses II. Biochemical parameters
Andrologia 9 : 95 - 105
114. Schirren, C. (1982)
Praktische Andrologie
Schering AG
2. Auflage
115. Shams-Borhan, G. and Harrison, R.A. (1981)
Production, characterization and use of ionophore-induced, calcium-dependent acrosome reaction in ram spermatozoa.
Gamete Res. 4 : 407 - 432
116. Shohet, S.B. (1972)
Hemolysis and changes in erythrocyte membrane lipids.
New Engl. J. Med. 286 : 577
117. Singh, J.P., Babcock, D.F. and Lardy, H.A. (1978)
Increased calcium-ion influx is a component of capacitation of spermatozoa.
Biochem. J. 172 : 549 - 556
118. Smith, K.D., Rodriguez-Rigau, L.J., Steinberger, E. (1977)
Relation between indices of semen analysis and pregnancy rate in infertile couples.
Fertil. Steril. 28 : 1314 - 1319

119. Steiner, R., Baumeister, T., Buhl, A. and Kaufmann R. (1982)
Motility measurements of human spermatozoa: comparison of dynamic light scattering and microphotographs
In: Sattelle, D.B., Lee, W.I., and Ware, B.R. (eds.)
Biomedical Applications of Laser Light Scattering
Elsevier Biomedical Press pp. 221 - 237
120. Suarez. S.S., Katz, D.F., and Overstreet, J.W. (1983)
Movement characteristics and acrosomal status of rabbit spermatozoa recovered at the site and time of fertilization.
Biol. Reprod. 29 : 1277 - 1287
121. Szöllosi, D., Hunter, R.H.F. (1978)
The nature and occurrence of the acrosome reaction in the domestic pig, *Sus Scrofa*.
J. Anat. 127 : 33 - 41
122. Talbot, P. and Franklin, L.E. (1976)
Morphology and kinetics of the hamster sperm acrosome reaction
J. Exp. Zool. 198 : 163 - 176
123. Talbot, P., Summers, R.G., Hylander, B.L., Keough, E.M., Franklin L.E. (1976)
The role of calcium in the acrosome reaction: an analysis using ionophore A 23187
J. Exp. Zool. 198 : 383 - 392
124. Talbot, P., Chacon, R.S. (1981)
A triple-stain technique for evaluation of normal acrosomal reactions of human sperm.
J. Exp. Zool. 215 : 201 - 208

125. Templeton, A. and Mortimer, D. (1980)
Laparoscopic sperm recovery in infertile women.
Br. J. Obstet Gynaec. 81 : 1128 - 1131
126. Templeton, A. and Mortimer, D. (1982)
The development of a clinical test of sperm migration
to the site of fertilization
Fertil. Steril.
127. Thibault, C., Dauzier, L., Wintenberger, S. (1954)
Etude cytologique de la fécondation in vitro de l'out de
la lapine
C.R. Séances Soc. Biol. (Paris) 148 : 789 - 790
128. Töpfer-Petersen, E., Heissler, E., Schill, W.-B.
(1985 a)
The kinetics of acrosome reaction - an additional sperm
parameter?
Andrologia, 17 : 224 - 227
129. Töpfer-Petersen, E., Völcker, Ch., Heissler, E.,
Schill, W.-B. (1985 b)
The kinetic of acrosome reaction in vitro in polyzoo-
spermia.
Fertil. Steril, in Vorbereitung
130. Toyoda, Y., Yokoyama, M., Hosi, T. (1971)
Studies on the fertilization of mouse eggs in vitro.
Jpn. J. Anim. Reprod. 16 : 145 - 157
131. Toyoda, Y., Chang, M.C. (1974)
Fertilization of rat eggs in vitro by epididymal sperma-
tozoa and the development of eggs following transfer.
J. Reprod. Fertil. 36 : 9 - 22

132. Tschesche, H., Wittig, B., Decker, G., Müller-Esterl, W., Fritz, H. (1982)
A new acrosin inhibitor from boar spermatozoa
Eur. J. Biochem. 285 : 1 - 6
133. Van Zyl, J.A., Menkveld, R., Kotze, T.J., van Retief, A.E., van Niekerk, W.A. (1975)
Oligozoospermia: a seven year survey of the incidence, chromosomal aberration, treatment and pregnancy rate.
Int. J. Fertil. 20 : 129 - 132
134. Vogt, H.-J., Schill, W.-B., Menken, T. (1984)
Impulszytrophotometrische Untersuchungen bei Polyzoospermie.
In: Fortschritte der Fertilitätsforschung 12.
(C. Schirren und K. Semm, Hrsg.)
Grosse Verlag, Berlin, S. 130 - 133
135. White, I.G., Larsen, L.H., and Wales, R.G. (1959)
Method for the in vitro collection of epididymal spermatozoa and for their comparison with ejaculated cells.
Fertil. Steril. 10 : 571 - 577
136. White, I.G., and Wales, R.G. (1961)
Comparison of epididymal and ejaculated semen of the ram.
J. Reprod. Fertil. 2 : 225 - 237
137. Yanagimachi, R., Chang, M.C. (1963)
Fertilization of hamster eggs in vitro
Nature 200 : 281 - 282
138. Yanagimachi, R. (1969 a)
In vitro capacitation of hamster spermatozoa by follicular fluid.
J. Reprod. Fertil. 18 : 275 - 286

139. Yanagimachi, R. (1969 b)
In vitro acrosome reaction and capacitation of golden hamster spermatozoa by bovine follicular fluid and its fractions.
J. Exp. Zool. 170 : 269 - 280
140. Yanagimachi, R. (1970)
The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation.
J. Reprod. Fertil. 23 : 193 - 196
141. Yanagimachi, R. and Noda, Y. D. (1970)
Physiological changes in the post-nuclear cap region of mammalian spermatozoa: a necessary preliminary to the membrane fusion between sperm and egg cells.
J. Ultrastr. Res. 31 : 486 - 493
142. Yanagimachi, R. (1972)
Fertilization of guinea-pig eggs in vitro
Anat. Rec. 174 : 9 - 20
143. Yanagimachi, R. and Usui, N. (1974)
Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea-pig spermatozoa.
Exp. Cell. Res. 89 : 161 - 171
144. Yanagimachi, R. (1975)
Acceleration of the acrosome reaction and activation of guinea-pig spermatozoa by detergents and other reagents.
Biol. Reprod. 13 : 519 - 526

145. Yanagimachi, R., Yanagimachi, H. and Rogers, B.J. (1976)
The use of zona-free animal ova on a test system for the assessment of fertilizing capacity of human spermatozoa.
Biol. Reprod. 15 : 471 - 476
146. Yanagimachi, R. (1977)
Specificity of sperm-egg interaction.
In: Immunobiology of Gametes (M. Edidin and M.H. Johnson, eds.).
Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 255 - 295
147. Yanagimachi, R. (1978)
Calcium requirement for sperm-egg fusion in mammals.
Biol. Reprod. 19 : 949 - 958
148. Yanagimachi, R. (1981)
Mechanisms of fertilization in mammals
In: Fertilization and Embryo Development in vitro (L. Mastroianni and J.D. Biggers, eds.)
Plenum Publ., New York, pp. 81 - 182
149. Yanagimachi, R., Kamiguchi, Y., Sugawara, S., Mikamo, K. (1983)
Gametes and fertilization in the chinese hamster
Gamete Res. 8 : 97 - 117
150. Yanagimachi, R. and Phillips, D.M. (1984)
The status of acrosomal caps of hamster spermatozoa immediately before fertilization in vivo.
Gamete Res. 9 : 1 - 19

9.

DANKSAGUNG

Prof. Dr. med. W.-B. Schill danke ich für die Überlassung des Themas der Doktorarbeit, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für die hilfreichen Ratschläge.

Ganz herzlich möchte ich Frau Dr. E. Töpfer-Petersen für die stetige und geduldige Diskussionsbereitschaft, die wertvollen Hinweise und die tatkräftige Unterstützung danken, die mir die Arbeit sehr erleichterten.

Besonders erwähnen möchte ich die Aufgeschlossenheit und Hilfsbereitschaft von Frl. Weiss und Frl. Spitzauer, die mir in vielen praktischen Fragen weiterhalfen.

Frau Feifel, Frau Koukouwetsos und Frau Kaiser danke ich ebenfalls für ihre Unterstützung bei Problemen technischer Art.

10. LEBENS LAUF

Am 4. Juli 1956 wurde ich als erster Sohn des Gymnasiallehrers Reinhard Völcker und seiner Frau Hildegard Völcker, geb. Ross, in Schwarzenbach/Saale geboren. Von 1962 bis 1971 besuchte ich die Grundschule und das Gymnasium in Traunstein. 1971 wechselte ich nach Pfaffenhofen/Ilm und besuchte bis 1975 das dortige Gymnasium.

Am 1. April 1976 wurde ich zum Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität zugelassen. Am 25. November 1983 schloß ich mein Studium mit dem medizinischen Staatsexamen ab.

Seit 15. Februar 1984 bin ich als Arzt für die Notrufzentrale des ADAC München tätig, wo ich für die Rückführung erkrankter oder verunglückter Urlauber aus ihrem Urlaubsland verantwortlich bin. Seit 1. August 1985 arbeite ich außerdem in der Allgemeinpraxis von Herrn Dr. med Gürster in Wartenberg, Kreis Erding, mit. Ich übernehme regelmäßig seine Feiertags- und Wochenenddienste. Außerdem führe ich während seiner Urlaubszeiten die Praxis selbständig.

Die experimentellen Arbeiten für meine Dissertation wurden in der Zeit vom 1. 2. 1983 bis 15. 11. 1985 im andrologischen Labor der Dermatologischen Universitätsklinik München unter der Leitung von Herrn Prof. Schill durchgeführt.

